

ZUR STABILITÄT VON ENTEROTOXIN B GEGENÜBER
PHYSIKALISCHEN EINFLÜSSEN

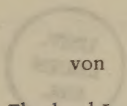
Eberhard Locher

1977

Aus dem Institut für Hygiene und Technologie der Lebensmittel
tierischen Ursprungs der Universität München
- Fachbereich Tiermedizin -
Lehrstuhl Prof. Dr. G. Terplan

ZUR STABILITÄT VON ENTEROTOXIN B GEGENÜBER
PHYSIKALISCHEN EINFLÜSSEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
des Fachbereichs Tiermedizin der Ludwig-Maximilians-Universität
München


von
Eberhard Locher
aus
Owen/Teck

München 1977

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches
Tiermedizin der Universität
München

Dekan: Prof. Dr. B. Vollmerhaus
Referent: Prof. Dr. G. Terplan
Korreferent: Prof. Dr. W. Kreuzer

Tag der Promotion: 29. Juli 1977



INHALTSVERZEICHNIS

A. Einleitung	1
B. Schrifttum	2
I. Staphylokokken-Enterotoxine	2
1. Enterotoxintypen und ihr Vorkommen	2
2. Wirkung der Enterotoxine	2
3. Bildung der Enterotoxine	3
II. Einfluß physikalischer Faktoren auf die Stabilität von Enterotoxin	3
1. Temperatureinflüsse	4
1.1. Temperaturen unter dem Gefrierpunkt	4
1.2. Kühlschranktemperatur	4
1.3. Zimmertemperatur	4
1.4. Temperaturen über 50°C	4
1.4.1. Einwirkung auf Enterotoxin A	4
1.4.2. Einwirkung auf Enterotoxin B	7
1.4.3. Einwirkung auf Enterotoxin C	11
1.4.4. Einwirkung auf Enterotoxin D	12
1.4.5. Einwirkung auf Enterotoxin E	12
2. γ -Strahlen	13
C. Eigene Untersuchungen	14
I. Material	14
II. Methodik	15
1. Wirkung natürlicher Umwelteinflüsse auf die Stabilität von Enterotoxin B	15
1.1. Sonnenlicht	15
1.2. Sonnenwärme	15
2. Wirkung simulierter Umwelteinflüsse auf die Stabilität von Enterotoxin B	16
2.1. Strahlen	16
2.1.1. UV-Strahlen	16
2.1.2. IR-Strahlen	16
2.1.3. Sichtbares Licht	17
2.2. Austrocknung	18
2.2.1. Austrocknung bei Zimmertemperatur	18
2.2.2. Austrocknung im Brutschrank	18
3. Wirkung verschiedener Temperatureinflüsse auf die Stabilität von Enterotoxin B	19
3.1. Temperaturen unter -10°C	19
3.2. Kühlschranktemperatur	19
3.3. Zimmertemperatur	20
3.4. Erwärmung im Brutschrank	20

3.5. Erwärmung im Wasserbad	20
3.6. Destillation	21
4. Ultraschall	23
5. Adsorption an Aktivkohle	24
6. Nachweisverfahren	25
6.1. OUCHTERLONYtest	25
6.2. MANCINITest	26
III. Ergebnisse	27
1. Wirkung natürlicher Umwelteinflüsse auf die Stabilität von Enterotoxin B	27
1.1. Sonnenlicht	27
1.2. Sonnenwärme	28
2. Wirkung simulierter Umwelteinflüsse auf die Stabilität von Enterotoxin B	28
2.1. Strahlen	28
2.1.1. UV-Strahlen	28
2.1.2. IR-Strahlen	30
2.1.3. Sichtbares Licht	31
2.2. Austrocknung	31
2.2.1. Austrocknung bei Zimmertemperatur	31
2.2.2. Austrocknung im Brutschrank	32
3. Wirkung verschiedener Temperatureinflüsse auf die Stabilität von Enterotoxin B	32
3.1. Temperaturen unter -10°C	32
3.2. Kühlschranktemperatur	32
3.3. Zimmertemperatur	32
3.4. Erwärmung im Brutschrank	33
3.5. Erwärmung im Wasserbad	33
3.6. Destillation	37
4. Ultraschall	38
5. Adsorption an Aktivkohle	40
D. Besprechung der Ergebnisse	42
E. Zusammenfassung	49
F. Literaturverzeichnis	51

A. EINLEITUNG

Lebensmittelvergiftungen durch Staphylokokken-Enterotoxine werden insbesondere auch nach Verbesserung der Nachweismethoden sehr oft diagnostiziert. Die Nachweisverfahren sind allerdings immer noch nicht optimal, so daß die Forschung auf diesem Gebiet weltweit weitergeht. Damit verbunden ist die Herstellung von hochgereinigten Antigenen, was wiederum Produktion von Rohtoxinen in größerem Umfang voraussetzt.

Bei der Produktion von Enterotoxin ist - bedingt durch die zahlreichen Verfahren der Reinigung und Konzentrierung - eine Kontamination der Laborräume und Geräte nicht ganz vermeidbar. Ebenso können die Abfälle nicht ohne Vorbehandlung bedenkenlos ins Abwasser geleitet werden.

Aufgabe dieser Arbeit war es zu ermitteln, ob und in wieweit Roh-enterotoxin B durch verschiedene physikalische Verfahren oder durch natürliche bzw. simulierte Umwelteinflüsse inaktiviert wird. Als nicht rein physikalisches Verfahren wurde zusätzlich die Dekontamination mittels Aktivkohle geprüft. Diese Verfahren sollten auch im Hinblick auf die praktische Anwendung im Labor und bei der Behandlung enterotoxinhaltiger Lebensmittel beurteilt werden.

B. SCHRIFTTUM

I. Staphylokokken-Enterotoxine

1. Enterotoxintypen und ihr Vorkommen

Enterotoxine sind wasserlösliche, aus einer Vielzahl von Aminosäuren bestehende Proteine (BERGDOLL, 1970) mit einem Molekulargewicht von 28 000 bis 35 000 u (BERGDOLL u. a., 1973). Sie werden unter bestimmten Bedingungen in Lebensmitteln und in geeigneten Nährmedien (BERGDOLL, 1969) hauptsächlich von koagulasepositiven und gelegentlich auch von koagulasenegativen Staphylokokken (BERGDOLL, 1970 und 1972) produziert. Aufgrund der Eiweißstruktur regen Enterotoxine die Bildung spezifischer Antikörper im lebenden Organismus an. 1959 gelang BERGDOLL u. a. der Nachweis eines spezifischen präzipitierenden Antikörpers mit enterotoxinneutralisierenden Eigenschaften. Damit war der Grundstein für serologische Nachweismethoden gelegt. Die Vermutung von SURGALLA u. a. (1953), daß verschiedene immunologische Enterotoxintypen existieren, wurde bestätigt. Entsprechend einer 1962 getroffenen Übereinkunft wurden die bis dahin bekannten Enterotoxintypen "F" und "E" in "A" beziehungsweise "B" umbenannt. Außerdem kam man überein, weitere serologisch identifizierte Enterotoxintypen in alphabetischer Reihenfolge zu benennen (CASMAN u. a., 1963).

Folgende Typen sind bis heute bekannt:

A (CASMAN, 1960), B (BERGDOLL u. a., 1959), C (BERGDOLL u. a., 1965) mit den beiden Varianten C₁ (BORJA und BERGDOLL, 1967) und C₂ (AVENA und BERGDOLL, 1967), D (CASMAN u. a., 1967), E (BERGDOLL u. a., 1971), F (BENNETT, 1971).

Der Typ A ist bei Lebensmittelvergiftungen am häufigsten beteiligt (BERGDOLL, 1967; CASMAN, 1967). Bei 75 Lebensmittelvergiftungsfällen isolierte Staphylokokkenstämme bildeten zu 49 % ausschließlich Enterotoxin A und zu 28,5 % Typ A in Verbindung mit anderen Typen. Enterotoxin D wurde bei 10 % der Staphylokokkenstämme alleine und bei ca 25 % zusammen mit Typ A nachgewiesen. Enterotoxin B bzw. C wurden nur bei weniger als 5 % der Stämme gefunden. Typ E und F waren bei dieser Untersuchung von CASMAN (1967) noch nicht serologisch abgegrenzt, so daß entsprechende Angaben fehlen.

2. Wirkung der Enterotoxine

Die orale Aufnahme führt beim Menschen im allgemeinen innerhalb von einer bis sechs Stunden (DACK, 1956) zu dem typischen Bild der Staphylokokken-Lebensmittelvergiftung. Die Symptome treten schlagartig auf: "the patient feeling well one moment but ill the next" (DANGERFIELD, 1973). Eingeleitet von Kopfschmerzen und heftigen Magenkrämpfen zeigen sich Würgen, Erbrechen, Durchfall, gelegentlich

auch leichte Übertemperatur (DANGERFIELD, 1973), in schweren Fällen tritt eine hochgradige Exsikkose auf. Todesfälle sind äußerst selten. Nach DACK (1956) ist die Empfindlichkeit des Menschen sehr variabel: Während z. B. bei einer Versuchsperson schon nach Aufnahme von 0,5 ml eines enterotoxinhaltigen Filtrates Erbrechen ausgelöst wurde, blieb für eine zweite Person der "Genuß" von 13 ml desselben Filtrates ohne jegliche Folgen. Neuere Versuche von DANGERFIELD (1973) an Freiwilligen mit hochgereinigtem Enterotoxin A, B und C ergaben für alle drei Typen eine abgeschätzte ID₅₀ ("illness dose") von 0,14 mcg/kg Körpergewicht. Schon bei 0,05 mcg/kg Körpergewicht erkrankte in jeder Vierergruppe mindestens eine Person. Innerhalb von 24 Stunden (DANGERFIELD, 1973), spätestens nach 72 Stunden (ANGELOTTI, 1969; BERGDOLL, 1970 und 1972) bessert sich der Zustand der Erkrankten zumeist ohne ärztliche Behandlung. So wird die Ursache dieser häufigen Lebensmittelvergiftung vielfach nicht diagnostiziert.

3. Bildung der Enterotoxine

Die höchsten Enterotoxinkonzentrationen werden in Nährmedien von Enterotoxin B bildenden Staphylokokken erreicht, gefolgt von Enterotoxin C Bildnern (BERGDOLL, 1972). Die Enterotoxin A-Ausbeute beträgt nur etwa 2 % der freigesetzten Enterotoxin B-Mengen (KATO u. a., 1936). Nach FRIEDMAN und WHITE (1965) sowie anderen Autoren findet die Enterotoxinsynthese in der Bakterienwand statt. Als Zeitpunkt der Enterotoxin B-Bildung geben die letztgenannten Autoren den Übergang von der logarithmischen Wachstumsphase zur stationären Phase an. McLEAN u. a. (1968) wiesen am Ende der logarithmischen Phase bei *Staphylococcus aureus* 243 Enterotoxin B nach. Die Enterotoxinbildung geht offensichtlich nicht mit dem Staphylokokkenwachstum einher. MARKUS und SILVERMAN (1970) deuteten Enterotoxin B daher als sekundäres Stoffwechselprodukt im Gegensatz zu Enterotoxin A, das während des logarithmischen Wachstums in beträchtlichem Umfang, jedoch in der stationären Phase kaum freigesetzt wurde und daher als primäres Stoffwechselprodukt bezeichnet wurde. Neuere Untersuchungen IANDOLO (1976) haben jedoch gezeigt, daß bei geeigneten Versuchsbedingungen Enterotoxin B ebenfalls in der frühen logarithmischen Wachstumsphase der Staphylokokken gebildet wird. Einzelheiten zu den verschiedenen die Enterotoxinbildung beeinflussenden Faktoren können der Arbeit von RICHTER (1974) entnommen werden.

II. Einfluß physikalischer Faktoren auf die Stabilität von Enterotoxin

Die in der Literatur zu findenden Angaben über den Einfluß physikalischer Faktoren auf die Aktivität und Stabilität von Staphylokokken-

Enterotoxinen betreffen fast ausschließlich die Einwirkung verschiedener Temperaturen. Dabei wird hinsichtlich der Aktivität unterschieden zwischen der serologischen (die mittels immunologischer Verfahren nachweisbar ist) und der biologischen Aktivität oder Toxizität (die im Freiwilligenversuch oder Tierversuch ermittelt wird).

Auf Publikationen, die erschienen bevor die Basis für den in vitro-Nachweis von Enterotoxin gegeben war (BERGDOLL u. a., 1959), soll hier nicht eingegangen werden, da nicht ausgeschlossen werden kann, daß die dort beschriebenen Ergebnisse durch andere Staphylokokken-Stoffwechselprodukte verfälscht wurden.

1. Temperatureinflüsse

1.1. Temperaturen unter dem Gefrierpunkt

Enterotoxin A (10-20 mcg/ml, 0.85 %ige Kochsalzlösung) konnte nach Angaben von TERPLAN und ZAADHOF (1974) in gefrorenem Zustand mehrere Monate ohne sichtbaren Toxizitätsverlust gelagert werden.

1.2. Kühlschranktemperatur

BORJA und BERGDOLL (1967) konnten nach einmonatiger Lagerung eine geringe Abnahme der serologischen Aktivität bei in 0,05 m Phosphatpuffer gelöstem Enterotoxin C₁ feststellen, während Enterotoxin E selbst nach sechs Monaten noch keinen deutlichen Aktivitätsverlust aufwies (BORJA u. a., 1972).

1.3. Zimmertemperatur

Während bei Enterotoxin A in 0,05 m Phosphatpuffer nur über "einige Tage" kein Verlust der biologischen Aktivität registriert wurde (SCHANTZ u. a., 1972), war Enterotoxin B in einem weiten pH-Bereich (4,0-7,3) über eine Woche und länger stabil (SCHANTZ u. a., 1965). Selbst bei pH 10 blieb die Toxizität von Enterotoxin B tagelang erhalten. Enterotoxin E zeigte sogar bei pH 11 bis zu zwei Wochen lang keinen signifikanten Aktivitätsabfall (BORJA u. a., 1972).

1.4. Temperaturen über 50°C

1.4.1. Einwirkung auf Enterotoxin A

Über den Einfluß einer Erhitzung auf die serologische bzw. biologische Aktivität von Enterotoxin A berichten CHU u. a. (1966), DENNY u. a. (1971), DANGERFIELD (1973), SOO u. a. (1973 a und b), NISKANEN und LINDROTH (1976) sowie TATINI (1976). In den folgenden Übersichten 1 und 2 sind einige Ergebnisse dieser Autoren zusammengefaßt. Dabei ist zu berücksichtigen, daß die aufgeführten Werte für die Einwirkungszeiten teilweise aus Inaktivierungskurven rückgerechnet wer-

den mußten, so daß geringfügige Unterschiede zu den Originalwerten bestehen können. Außerdem ist bei diesem Vergleich zu beachten, daß hinsichtlich des Nachweisverfahrens zum Teil unterschiedliche Nachweisgrenzen genannt wurden.

Übersicht 1: Serologische Aktivität von Enterotoxin A
nach Erhitzung auf Temperaturen bis 100°C

Toxin- quali- tät	Anfangs- konzentration (mcg/ml)	pH	Hitze- wirkung °C min		Nach- weis- ver- fahren	Restak- tivität %	Quelle (xx)
rein	1x10 ⁻⁵	7,5	55	10	RIA	85	(6)
rein	1x10 ⁻⁵	7,5	58	10	RIA	50	(6)
rein	1x10 ⁻⁵	7,5	60	10	RIA	45	(6)
rein	200 x)	6,85	60	20	?	50	(1)
rein	200 x)	6,85	70	3	?	60	(1)
	5		70	15	?	0,2	(5)
	1		70	15	?	0,1	(5)
rein	200 x)	6,85	80	3	?	neg.	(1)
	5		90	15	?	0,4	(5)
	1		90	15	?	1,0	(5)
rein	200 x)	6,85	100	1	?	neg.	(1)
roh	90 x)	7,2	100	106	ODIN	3,6	(2)
roh	60	6,2	100	190	ODIN	neg.	(3)
roh	21 x)	7,2	100	130	ODIN	neg.	(2)
roh	5	6,2	100	130	ODIN	neg.	(3)

x) gelöst in Puffer

- xx)
- (1) CHU u. a. (1966)
 - (2) HILKER u. a. (1968)
 - (3) DENNY u. a. (1971)
 - (4) SOO u. a. (1973a)
 - (5) SOO u. a. (1973b)
 - (6) NISKANEN und LINDROTH (1976)

Übersicht 2: Serologische Aktivität von Enterotoxin A
nach Erhitzung auf Temperaturen über 100°C

Toxin- quali- tät	Anfangs- konzentration (mcg/ml)	pH	Hitze- ein- wirkung °C min		Nach- weis- ver- fahren	Restak- tivität %	Quel- le xx)
roh	90 ^{x)}	7,2	110	47	LOUDIN	3,6	(2)
roh	21 ^{x)}	7,2	110	47	LOUDIN	4,8	(2)
roh	21 ^{x)}	7,2	110	59	LOUDIN	neg.	(2)
roh	90 ^{x)}	7,2	121	18	LOUDIN	3,6	(2)
roh	60	6,2	121	40	LOUDIN	neg.	(3)
roh	60 ^{x)}	7,2	121	12	LOUDIN	neg.	(3)
roh	21 ^{x)}	7,2	121	18	LOUDIN	4,8	(2)
roh	21 ^{x)}	7,2	121	22	LOUDIN	neg.	(2)
roh	20	6,2	121	37	LOUDIN	neg.	(3)
roh	20 ^{x)}	7,2	121	10	LOUDIN	neg.	(3)
roh	5	6,2	121	27	LOUDIN	neg.	(3)
roh	5 ^{x)}	7,2	121	5	LOUDIN	neg.	(3)
	1	6,6	121	18	?	neg.	(4)
	1	6,2	121	16	?	neg.	(4)
	0,1	6,6	121	3,8	?	neg.	(4)
roh	21 ^{x)}	7,2	126,6	14	LOUDIN	neg.	(2)

^{x)} gelöst in Puffer

xx) siehe Übersicht 1

Ein direkter Vergleich der einzelnen Ergebnisse ist aufgrund der unterschiedlichen Bedingungen nicht möglich, doch zeigte sich in den Versuchen von HILKER u. a. (1968) sowie DENNY u. a. (1971), daß bei höheren Ausgangskonzentrationen auch die prozentuale Restaktivität höher ist. DENNY u. a. erklärten diese Beobachtung als einen verstärkten gegenseitigen Schutz der Proteinmoleküle. Diese Theorie wurde von ihnen durch die Feststellung gestützt, daß in Fleischbouillon eine längere Erhitzungszeit für die vollständige Inaktivierung des Enterotoxins erforderlich war als in Phosphatpuffer. In Milch befindliches Enterotoxin wird offensichtlich noch langsamer inaktiviert (TATINI, 1976). Nach TATINI ist der pH-Wert des Erhitzungsmediums ebenfalls von Bedeutung für die Inaktivierungsrate, da Enterotoxin A bei pH = 5,5 schneller inaktiviert wurde als bei pH-Werten von 6,5 und höher. Auch DENNY u. a. (1973) hatten darauf hingewiesen, daß Enterotoxin A bei pH 5,3 in weniger als einer Minute (121°C) vollständig inaktiviert wurde, während bei pH 7,8 noch nach sieben Minuten eine Restaktivität gegeben war.

DENNY u. a. (1966) sowie DANGERFIELD (1973) prüften, inwieweit die biologische Aktivität von Enterotoxin A durch die Erhitzung verändert wird. Die erstgenannten Autoren verwendeten für diese Zwecke den Affenfütterungstest (ca 47 mcg/Tier) bzw. den Kätzchentest

(ca 2,3 mcg/Tier) und beobachteten ein Ausbleiben positiver Reaktionen bei auf 121°C erhitztem Toxin nach 11 Minuten (Katzen) bzw. 8 Minuten (Affen).

Nach Auswertung einer Versuchsreihe mit unerhitztem bzw. 25 Minuten auf 100°C erhitztem Enterotoxin A mit freiwilligen Testpersonen kam DANGERFIELD (1973) zur Auffassung, daß die Toxizität für den Menschen beim Erhitzen möglicherweise erhöht wird ("possibly potentiated by heat"). Diese Ergebnisse wurden von TATINI (1976) an Kätzchen und Affen bestätigt.

Von Interesse ist, daß es bei hitzegeschädigtem Enterotoxin A zu einer teilweisen Reaktivierung kommt, wenn es mit Harnstoff behandelt wird (SOO u. a., 1973b). So stieg zum Beispiel die serologische Aktivität eines 15 Minuten bei 70°C erhitzten Enterotoxins mit einer Ausgangskonzentration von 5 mcg/ml von 0,2 % (erhitzte, unbehandelte Probe) auf 6,4 % (erhitzte, Harnstoff-behandelte Probe).

In ergänzenden Versuchen von TATINI (1976) stellte sich dann heraus, daß auch die biologische Aktivität (Kätzchentest) erhitzten Toxins durch Harnstoff gesteigert wird.

1.4.2. Einwirkung auf Enterotoxin B

Die meisten Mitteilungen zur temperaturbedingten Inaktivierung von Staphylokokken-Enterotoxinen betreffen den Typ B. Hierzu liegen Publikationen u. a. von SCHANTZ u. a. (1965), READ und BRADSHAW (1966a und b), SATTERLEE und KRAFT (1969), JAMLANG u. a. (1971), DANGERFIELD (1973), FUNG u. a. (1973), STINSON und TROLLER (1974), REICHERT und FUNG (1976) sowie TATINI (1976) vor.

In den folgenden Übersichten 3 und 4 sind einige dieser Ergebnisse zusammengestellt.

Übersicht 3: Serologische Aktivität von Enterotoxin B
nach Erhitzung auf Temperaturen bis 100°C

Toxin- quali- tät	Anfangs- konzen- tration (mcg/ml)	pH	Hitzeein- wirkung °C min		Nach- weis- ver- fahren	Restak- tivität %	Quel- le xx)
rein	100 x)	6,4	60	120	UDIN	70	(5)
roh	50 x)	7,4	60	204	UDIN	50	(4)
rein	50 x)	7,4	60	204	UDIN	50	(4)
rein	100 x)	6,4	70	20	UDIN	10	(5)
rein	100 x)	6,4	80	15	UDIN	10	(5)
roh	100	7,6	80	300	UDIN	5-10	(6)
roh	50 x)	7,4	80	14	UDIN	50	(4)
rein	50 x)	7,4	80	12	UDIN	50	(4)
roh	50 x)	7,4	80	240	UDIN	neg.	(4)
rein	5		80	5	UDIN	21	(8)
rein	5		80	20	UDIN	4	(8)
rein	5 x)	7,4	80	10	UDIN	neg.	(8)
rein	100 x)	6,4	90	90	UDIN	10	(5)
roh	30 x)	7,2	99	107	OAKLEY	2	(2)
rein	30 x)	7,2	99	87	OAKLEY	2	(2)
rein	30	6,5	99	134	OAKLEY	1,5	(3)
roh	100	7,6	100	180	UDIN	neg.	(6)
rein	100 x)	6,4	100	60	UDIN	10	(5)
roh	50 x)	7,4	100	37	UDIN	50	(4)
rein	50 x)	7,4	100	24	UDIN	50	(4)
rein	5 x)	7,4	100	5	UDIN	8	(8)
rein	5 x)		100	5	UDIN	25	(8)

x) gelöst in Puffer

xx) siehe Übersicht 4

Übersicht 4: Serologische Aktivität von Enterotoxin B
nach Erhitzung auf Temperaturen über 100°C

Toxin- quali- tät	Anfangs- konzentration (mcg/ml)	pH	Hitzeein- wirkung °C min		Nach- weis- ver- fahren	Restak- tivität %	Quel- le xx)
roh	50 x)	7,4	110	17	LOUDIN	50	(4)
rein	50 x)	7,4	110	16	LOUDIN	50	(4)
roh	30 x)	7,2	110	49	LOUDIN	2	(2)
rein	30 x)	7,2	110	39	LOUDIN	2	(2)
rein	30	6,5	110	51	LOUDIN	1,5	(3)
roh	100	7,6	121	30	LOUDIN	neg.	(6)
roh	30 x)	7,2	121	19	LOUDIN	2	(2)
rein	30 x)	7,2	121	16	LOUDIN	2	(2)
rein	30	6,5	121	18	LOUDIN	1,5	(3)
	10	7,2	121	62	LOUDIN	10	(7)

x) gelöst in Puffer

- xx)
- (1) SCHANTZ u. a. (1965)
 - (2) READ und BRADSHAW (1966a)
 - (3) READ und BRADSHAW (1966b)
 - (4) SATTERLEE und KRAFT (1969)
 - (5) JAMLANG u. a. (1971)
 - (6) FUNG u. a. (1973)
 - (7) STINSON und TROLLER (1974)
 - (8) REICHERT und FUNG (1976)

Wenn auch die einzelnen Ergebnisse einen guten Überblick verschaffen, so ist ein direkter Vergleich aufgrund der unterschiedlichen Versuchsbedingungen nur unter Vorbehalt möglich. Die in der Übersicht wiedergegebenen Resultate wie auch weitere Angaben erlauben jedoch diese Schlußfolgerungen:

1. Enterotoxin B ist hitzeresistenter als Enterotoxin A (TATINI, 1976);
2. Ungereinigtes Enterotoxin B ist hitzestabiler als gereinigtes (READ und BRADSHAW, 1966a; SATTERLEE und KRAFT, 1969). Dieses Phänomen wird von den letztgenannten Autoren auf einen Schutz der Enterotoxinmoleküle durch andere Proteine zurückgeführt. Inwiefern diese Erklärung stichhaltig ist, ist unklar, wenn man berücksichtigt, daß Enterotoxin B in Gegenwart von Myosin bzw. Metmyoglobin oder in "Fleischbrei" schneller inaktiviert wurde als nur in Phosphatpuffer (SATTERLEE und KRAFT, 1969). Diese Erscheinung wurde damit von diesen Autoren zu erklären versucht, daß ein Teil des Enterotoxins fest an die Fleischproteine gebunden wurde und somit für den Nachweis nicht verfügbar war, während ungebundenes Enterotoxin schneller inaktiviert werden konnte.

3. In den ersten Minuten der Erhitzung kommt es zu einer sehr raschen Inaktivierung, während die Aktivität später nur noch langsam abnimmt. SATTERLEE und KRAFT (1969) berichteten z. B., daß bei einer Erhitzung auf 80°C 67,5 % des Enterotoxins B innerhalb der ersten 15 Minuten inaktiviert wurden, die restlichen 32,5 % aber erst nach weiteren 210 Minuten. Nach Angaben von REICHERT und FUNG (1976) wurde Enterotoxin B bei einer Erhitzung auf 80°C bereits innerhalb von 20 bis 30 Sekunden zu 28 bis 40 % inaktiviert.
4. Anfänglich (nach FUNG u. a., 1973 in den ersten 10 bis 30 Minuten) wird auf 80°C erhitztes Enterotoxin (SATTERLEE und Kraft, 1969; JAMLANG u. a., 1971; FUNG u. a., 1973; REICHERT und FUNG, 1976) bzw. auch nur auf 70°C erhitztes (JAMLANG u. a., 1971) schneller inaktiviert als auf 90, 100 bzw. 110°C erhitztes Enterotoxin. Später ist die Inaktivierungsrate bei 100°C jedoch höher (SATTERLEE und KRAFT, 1969; FUNG u. a., 1973). Das unterschiedliche Verhalten von Enterotoxin B bei 70 bzw. 80°C einerseits und 90, 100 bzw. 110°C andererseits wird von SATTERLEE und KRAFT (1969) mit einer Komplexbildung bei niedrigeren Temperaturen zu erklären versucht, während JAMLANG u. a. (1971), FUNG u. a. (1973) sowie REICHERT und FUNG (1976) von einer reversiblen Aggregation und/oder Strukturveränderung der Enterotoxinmoleküle bei 70 bis 80°C ausgehen.
5. Eine teilweise Reaktivierung hitzeinaktivierten Enterotoxins B ist möglich (JAMLANG u. a., 1969; FUNG u. a., 1973; REICHERT und FUNG, 1976).
Die erstgenannten Autoren beobachteten eine Reaktivierung von zuvor auf 70 bzw. 80°C erhitzten Proben, die anschließend sechs Minuten gekocht wurden. Die Restaktivität von 10 % stieg dabei auf 35 bis 40 %. Die Arbeitsgruppe von FUNG registrierte dagegen eine Reaktivierung bei 24 stündiger Lagerung von Proben, die auf 80, 100 bzw. 121°C erhitzt worden waren. Dabei war die Reaktivierung bei Lagerung bei 25°C deutlich stärker als bei 4°C. Sie trat allerdings nur ein, sofern vor der Lagerung noch eine gewisse Restaktivität immunologisch nachweisbar war. Der Grad der Reaktivierung war abhängig von der Erhitzungstemperatur und -zeit sowie von der Inaktivierungsrate. Bei auf 80°C erhitzten Proben war er infolgedessen stärker als bei Proben, die für gleiche Zeit auf 100°C erhitzt worden waren. Außerdem spielt offensichtlich auch das Medium eine Rolle, in dem das Enterotoxin suspendiert ist. In phosphatgepufferter physiologischer Kochsalzlösung war von REICHERT und FUNG (1976) z. B. keine Reaktivierung von Enterotoxin B feststellbar, wohl aber in Hirn-Herz-Medium oder in anderen eiweißhaltigen Medien.
FUNG u. a. (1973) versuchen das Phänomen der Reaktivierung so zu erklären, daß sich bei der Erhitzung einige Enterotoxinmoleküle vollständig entfalten, andere nur teilweise, während einige intakt bleiben. Unter geeigneten Bedingungen werden einige der teilweise

entfalteten Enterotoxinmoleküle in ihren ursprünglichen Zustand zurückgeführt, so daß - da nur diese immunologisch nachweisbar sind - das Phänomen einer Reaktivierung des Enterotoxins sichtbar wird.

6. Der Grad der Inaktivierung von Enterotoxin B ist abhängig von der Ionenkonzentration (JAMLANG u. a. , 1971) und Art des Mediums (READ und BRADSHAW, 1966a und b; REICHERT und FUNG, 1976 u. a.). Während der pH-Wert (4,5 - 6,4 - 7,5) bei einer Erhitzung auf 70°C ohne Einfluß war, war auf 100°C erhitztes Enterotoxin B bei pH 6,4 stabiler als bei den beiden anderen pH-Werten (JAMLANG u. a. , 1971).
7. Zwischen serologischer und biologischer Aktivität (SCHANTZ u. a. , 1965; READ und BRADSHAW, 1966a; JAMLANG u. a. , 1971; DAN-GERFIELD, 1973) erhitzten Enterotoxins scheinen kaum Unterschiede zu bestehen, zumal auch die biologische Restaktivität auf 70°C erhitzten Enterotoxins durch sechsinuitiges Kochen gesteigert werden konnte (JAMLANG u. a. , 1971).

1.4.3. Einwirkung auf Enterotoxin C

Nach einer Erhitzung von Enterotoxin C₁ (120-140 mcg/ml) auf 55°C (1 Stunde) bzw. 60°C (1/2 Stunde) konnte keine serologische Aktivitätsabnahme festgestellt werden (BORJA und BERGDOLL, 1967). Nach der einstündigen Erhitzung auf 60°C kam es allerdings zu einer Trübung der Enterotoxinlösung. Bei Enterotoxin C₂ zeigte sich diese Veränderung allerdings schon bei 52°C (AVENA und BERGDOLL 1967). Nach einminütigem Erhitzen auf 100°C wurde ein Aktivitätsverlust von etwa 80 % ermittelt. Nach FUNG u. a. (1973) betrug die serologische Aktivität eines fünf Stunden bei 80°C erhitzten Rohtoxins (pH 7,4) 5-10 % der Ausgangskonzentration von 100 mcg/ml; bei Temperaturen von 100°C bzw. 121°C war nach 180 Minuten bzw. 30 Minuten kein Enterotoxin mehr nachweisbar. Auffällig war, daß das Rohtoxin wie auch Enterotoxin B anfänglich (erste 10 bis 30 Minuten) bei 80°C schneller inaktiviert wurde als bei 100°C, daß anschließend aber die Inaktivierung bei 100°C schneller vonstatten ging. Nach einer Lagerung der erhitzten Proben (24 Stunden bei 25°C) kam es - ebenfalls ähnlich Enterotoxin B - zu einer deutlichen Reaktivierung des Enterotoxins, sofern es seine serologische Aktivität bei der vorhergehenden Erhitzung nicht vollständig eingebüßt hatte. Erfolgte die Lagerung statt bei 25°C bei 4°C, war keine oder höchstens eine geringfügige Reaktivierung zu beobachten.

Durch weitere Versuche mit hochreinem Enterotoxin C konnten die letztgenannten Autoren feststellen, daß in Puffer gelöstes Enterotoxin schneller inaktiviert wurde als in Kulturmedium gelöstes Enterotoxin, z. B. bei 100°C nach einer Stunde gegenüber drei Stunden.

1.4.4. Einwirkung auf Enterotoxin D

Die Ergebnisse von verschiedenen Erhitzungsversuchen mit Enterotoxin D sind von TATINI (1976) zusammenfassend dargestellt. Danach fanden SOO u. a. (1973b) die in der Übersicht 5 wiedergegebenen Daten, aus denen hervorgeht, daß die Inaktivierungsrate nach 7,5 Minuten bei 70°C größer war als bei 90°C und daß der Aktivitätsverlust von der Toxinkonzentration abhängig war. Auch der pH-Wert beeinflusste die Thermostabilität: Enterotoxin D wurde - im Gegensatz zu Enterotoxin A - bei pH 6,5 schneller inaktiviert als bei pH $\leq$ 5,5. In Milch wurde Enterotoxin D in geringerem Umfang inaktiviert als in Pufferlösung. SOO u. a. (1973a) ermittelten einen Wert von 19,8 Minuten für F_{250}^{52} bei einer Ausgangskonzentration von 1 mcg Enterotoxin D/ml. Die ersten Ergebnisse von Erhitzungsversuchen mit Enterotoxinkonzentrationen deutlich unter 1 mcg/ml stammen ebenfalls von TATINI (1976): Nach einer Erhitzung von 9,12 Sekunden bei 143,3°C war Enterotoxin D selbst bei einer Anfangskonzentration von 0,005 mcg/ml Milch noch nicht vollständig inaktiviert.

Übersicht 5: Serologische Aktivität von Enterotoxin D
nach Erhitzung auf 70 bzw. 90°C (Erhitzungsdauer jeweils 7,5 Minuten)

Temperaturstufe (°C)	70	70	90	90
Anfangskonzentration (mcg/ml)	5	0,5	5	0,5
Restaktivität (%)	3	8	6	24
Restaktivität nach Reaktivierung ^{x)}	95	-	95	-

^{x)} in Anwesenheit von Harnstoff

Für eine Reaktivierung hitzegeschädigten Enterotoxins D war - wie beim Typ A - ebenfalls eine Behandlung mit Harnstoff erforderlich (SOO u. a., 1973).

1.4.5. Einwirkung auf Enterotoxin E

BORJA u. a. (1972) untersuchten die Wirkung von verschiedenen Hitzebehandlungen auf Enterotoxin E. Sie stellten einen serologischen Aktivitätsverlust fest

von	5 % bei	55°C -	60 Minuten
	10 % bei	60°C -	60 Minuten
	40 % bei	70°C -	60 Minuten
	55 % bei	80°C -	20 Minuten
	85 % bei	90°C -	10 Minuten
	95 % bei	100°C -	5 Minuten

Hingegen blieb die Aktivität erhalten, wenn Enterotoxin E zwei Stunden auf 45°C erhitzt wurde.

2. γ -Strahlen

Den Einfluß der γ -Strahlen auf Enterotoxin B prüften READ und BRADSHAW (1967). In Modellversuchen simulierten sie Bedingungen, die bei der Radiosterilisation und bei der Radiopasteurisation herrschen. Ausschließlich hochgereinigtes Enterotoxin B, einerseits in Veronalpuffer (pH 7,2) in einer Konzentration von 31 mcg/ml, andererseits in homogenisierter Vollmilch (Toxingehalt 30 mcg/ml) gelöst, wurde mit einer Kobalt - 60 - Quelle bestrahlt. Bei 5 Mrad (Veronal-Toxinmischung) bzw. 20 Mrad (Milch-Toxinmischung) war Enterotoxin mit dem verwendeten Doppel-Gel-Diffusionstest, der eine Nachweisgrenze von 0,5 - 0,7 mcg Enterotoxin B/ml hatte, nicht mehr nachzuweisen. Aus diesen Daten wurde die für einen 90 %igen Aktivitätsverlust erforderliche Dosis mit 2,7 Mrad (Veronalpuffer) bzw. 9,7 Mrad (Milch) errechnet. Im Kätzchentest, der nur mit der Veronalpuffer-Toxinmischung durchgeführt werden konnte, ergaben sich vergleichbare Werte.

Bei der in den USA angewandten Nahrungsmittelbestrahlung zur Sterilisation und Pasteurisation wird Enterotoxin B nicht restlos inaktiviert.

Nach Ansicht der Autoren würde z. B. für eine Rohmilch mit einem Enterotoxin B Gehalt von 5 mcg/ml eine Bestrahlungsdosis von 40 Mrad erforderlich sein, um den Enterotoxingehalt soweit zu inaktivieren, daß er sich auf weniger als 0,004 mcg/ml beliefe und somit der Konsum von 250 ml Milch für den Menschen genußunschädlich sei, da der Gesamttoxingehalt dann unter der als emetisch wirksamen Dosis von 1 mcg liege.

C. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

I. Material

Der Einfluß verschiedener physikalischer Faktoren auf die Stabilität von Enterotoxin B wurde unter Verwendung von *Staphylococcus aureus* 243 (ATCC 14458) geprüft. Dieser Stamm war dem Institut von Professor M. S. Bergdoll, Food Research Institute of the University of Wisconsin in Madison (USA) zur Verfügung gestellt worden. In Hinblick auf den geringeren Arbeitsaufwand und die Vermeidung einer Abschwächung des Enterotoxinbildungsvermögens wurden die Staphylokokken an Porzellanbruchstücke angetrocknet aufbewahrt (BAUMGART, 1970). Zur Anzüchtung der Kultur wurden jeweils zwei Porzellanbruchstücke in 200 ml Nährbouillon (Oxoid; CM 1) verbracht, die 12 Stunden bei 37°C bebrütet wurde. Zur eigentlichen Enterotoxinproduktion wurde eine Bouillon aus 4 % Protein Hydrolysate Powder (Mead Johnson) - pH 6,8 - verwendet, die mit 5 % der staphylokokkenhaltigen Nährbouillon beimpft wurde. Das beimpfte PHP-Medium wurde in sterile 2 l-Erlenmeyerkolben in Mengen von ca 700 ml abgefüllt und anschließend im Schüttelbrutschrank (275 Umdrehungen/min) 48 Stunden bei 37°C inkubiert.

Nach der Bebrütung wurde das PHP-Medium in einen Druckbehälter verbracht und mit einem Druck von etwa 5 atü über ein Druckfiltrationsgerät (Selecta, MD 293/0) durch einen Vorfilter (Selecta, GF 92) und einen Hauptfilter (Selectron, BA 90) mit einer Porengröße von 0,6 µm gepreßt. Das so gewonnene Kulturfiltrat war bernsteingelb und klar und wurde in 1000 ml-Portionen im Kühlschrank bei 4°C bis zur Verwendung gelagert.

Die serologische Aktivität wurde sofort und in monatlichen Abständen qualitativ (OUCHTERLONYtest) und quantitativ (MANCINItest) ermittelt.

Vor Versuchsbeginn wurde der Enterotoxingehalt des Kulturfiltrates unter Zusatz von physiologischer Kochsalzlösung auf 70 mcg/ml eingestellt. Der pH dieser Lösung lag bei 7,3±0,1.

Für die weiteren Verdünnungen auf 7 beziehungsweise 0,7 mcg/ml wurde Aqua destillata verwendet.

Für Versuche mit Enterotoxin B in Substanz wurde ein Teil des Kulturfiltrates lyophilisiert. Dazu wurde das Enterotoxinkulturfiltrat schnell und schonend bei -20°C eingefroren und anschließend in einer Gefriertrocknungsanlage lyophilisiert. (Christ, Delta Ia).

Das Lyophilisat wurde in luftdicht verschlossenen Fläschchen in Portionen zu 700 mcg beziehungsweise 3500 mcg Enterotoxin B (bestimmt im MANCINI-Test) bei -20°C gelagert.

II. Methodik

1. Wirkung natürlicher Umwelteinflüsse auf die Stabilität von Enterotoxin B

1.1. Sonnenlicht

Im Vorversuch wurden Glas-Petrischalen mit 10 ml Kulturfiltrat (7,0 mcg Enterotoxin B/ml) drei Tage lang so aufgestellt, daß sie von Sonnenaufgang bis Sonnenuntergang der Einwirkung der Sonne ausgesetzt waren. Die Proben wurden mit Petrischalendeckeln verschlossen, da die starke Verdunstung, die beim ersten Vorversuch - ohne Verschließen der Petrischalen - zu beobachten war, befürchten ließ, daß ein etwaiger Toxizitätsverlust nicht nur durch die Bestrahlung, sondern auch durch die Austrocknung bedingt sein könnte. Die Deckel hatten jedoch Brennglaseffekt. Die Temperaturen im Kulturfiltrat stiegen bis auf 63°C.

Schließlich wurde folgende Versuchsanordnung gewählt (Für jede Reihe zwei 250 ml-Bechergläser mit je 100 ml Kulturfiltrat; 7 mcg/ml):

Reihe 1: Die Verdunstung wurde nicht verhindert, der Flüssigkeitsverlust wurde erst bei Versuchsende ersetzt (100 ml physiologische Kochsalzlösung).

Reihe 2: Dreimal täglich wurde der Flüssigkeitsverlust mit physiologischer Kochsalzlösung ersetzt.

Reihe 3: Die Verdunstung wurde dadurch unterbunden, daß die Bechergläser mit Cellophan weitgehend luftdicht verschlossen wurden.

Reihe 4: Die Bechergläser wurden mit einer Glasplatte abgedeckt, der geringe Verdunstungsverlust erst bei Versuchsende mit physiologischer Kochsalzlösung ergänzt.

1.2. Sonnenwärme

Ein würfelförmiger Holzrahmen wurde an fünf Seiten mit schwarzer Dachpappe überzogen und so aufgestellt, daß er den ganzen Tag dem Sonnenschein ausgesetzt war. Die einzige offene Würfelseite war nach Norden ausgerichtet. Damit wurde erreicht, daß die im Würfel platzierten offenen Petrischalen nie direkt von der Sonne bestrahlt wurden. Die Proben - zwei Serien zu je fünf Petrischalen mit jeweils 10,0 ml Kulturfiltrat (7,0 mcg Enterotoxin B/ml) - wurden der Sonnenwärme 72 Stunden (drei aufeinanderfolgende Schönwettertage) lang ausgesetzt.

Die Proben der ersten Reihe - Versuchsbeginn acht Uhr - waren nach rund vier Stunden, die der zweiten Reihe - Versuchsbeginn bei Sonnenhöchststand - schon nach dreieinhalb Stunden völlig eingetrocknet. Bei Versuchsende wurde der Rückstand in jeder Petrischale in 10,0 ml physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt.

2. Wirkung simulierter Umwelteinflüsse auf die Stabilität von Enterotoxin B

2.1. Strahlen

2.1.1. UV-Strahlen

Die Wirkung der UV-Strahlen (UV-Laborlampe, Original Hanau, Type 5136) auf das Enterotoxin des Kulturfiltrates wurde in einem Vorversuch über Zeiträume von einer bis vierundzwanzig Stunden bei Toxinkonzentrationen von 70 bzw. 7 mcg/ml geprüft. Da es zu keiner meßbaren Inaktivierung kam, wurde die Bestrahlungszeit im Hauptversuch auf mehrere Tage ausgedehnt, die relative Luftfeuchte war 60 % (mit Ausnahme der dritten Versuchsreihe).

Reihe 1: Toxinkonzentration: 7,0 mcg/ml; Bestrahlungsdauer: einen bis einundzwanzig Tage.

Insgesamt wurden 42 Petrischalen ohne Deckel mit je 10 ml des verdünnten Kulturfiltrates bestrahlt. Täglich wurden zwei von diesen Proben entnommen und bei -12°C eingefroren. Der Flüssigkeitsverlust, der durch Verdunsten auftrat, wurde im Abstand von drei Tagen und jeweils bei Versuchsende mit physiologischer Kochsalzlösung ersetzt.

Reihe 2: Toxinkonzentration: 0,7 mcg/ml; Bestrahlungsdauer: einen bis vierzehn Tage.

14 Petrischalen wurden bestrahlt. Die weitere Behandlung der Proben deckte sich mit der der Reihe 1.

Reihe 3: Toxinkonzentration: 7,0 mcg/ml; Bestrahlungsdauer: zwei bis zehn Tage.

Insgesamt wurden in einer feuchten Kammer (100 % relative Luftfeuchte) 15 Petrischalen mit je 10 ml des verdünnten Kulturfiltrates bestrahlt (dreifacher Ansatz). Im Abstand von jeweils zwei Tagen wurden drei Proben entnommen. Die Verdunstungsverluste wurden stets erst bei Versuchsende ersetzt (physiologische Kochsalzlösung).

Reihe 4: Toxinmenge: 700 mcg; Bestrahlungsdauer: sieben, vierzehn bzw. einundzwanzig Tage.

Insgesamt wurden sechs Petrischalen (ohne Deckel) mit lyophilisiertem Kulturfiltrat beschickt. Nach jedem der drei verschiedenen langen Bestrahlungszeiträume wurden zwei von diesen Proben entnommen und mit je 100 ml physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt.

2.1.2. IR-Strahlen

Die Versuche wurden in einer feuchten Kammer beziehungsweise in einem freien Raum mit einer relativen Luftfeuchte von 55 % durchgeführt. Die enterotoxinhaltigen Kulturfiltrate wurden in offenen Petrischalen beziehungsweise in mit Gummistopfen verschlossenen Baby-

flaschen aufgestellt und bestrahlt. Alle Versuche fanden in einem verdunkelten Raum mit geringer Luftbewegung statt. Als Infrarotstrahler diente eine IR-Lampe (Theratherm 250 Watt, Osram).

- Reihe 1: Je 10,0 ml Filtrat mit 7,0 mcg/ml Enterotoxin B wurden in fünf Petrischalen 24 Stunden lang in der feuchten Kammer bestrahlt. Die relative Luftfeuchte betrug 100 %. Ein Flüssigkeitsverlust durch Verdunstung konnte nicht festgestellt werden. Die Temperatur in der feuchten Kammer lag bei 42°C.
- Reihe 2: Filtratmenge, Toxinkonzentration und Anzahl der Proben waren gleich wie bei Reihe 1. Die fünf Petrischalen wurden jedoch bei 55 % relativer Luftfeuchte 24 Stunden lang IR-bestrahlt. Die Temperatur in den Petrischalen betrug 39-41°C. Die Verdunstungsverluste wurden erst bei Versuchsende mit physiologischer Kochsalzlösung ersetzt.
- Reihe 3: Kulturfiltrate (10,0 ml; 7,0 mcg/ml) wurden in der feuchten Kammer bzw. im freien Raum (relative Luftfeuchte 55 %) IR-bestrahlt. Abweichend von Reihe 1 beziehungsweise Reihe 2 wurden Proben auch bereits nach zwei, vier, sechs und zwölf Stunden IR-Bestrahlung auf ihre serologische Aktivität getestet.
- Reihe 4: Drei Babyflaschen mit je 100 ml Kulturfiltrat (7,0 mcg/ml) wurden mit Gummistopfen verschlossen und sechs Tage lang bestrahlt. Die Temperatur der Kulturfiltrate betrug 47°C. Täglich wurde nach kräftigem Durchmischen des Inhalts je eine Probe von 1,0 ml entnommen und eingefroren. Bei Versuchsende wurden alle 18 Proben aufgetaut und in ihrer serologischen Aktivität mit drei nicht bestrahlten Kontrollproben verglichen.

2.1.3. Sichtbares Licht

Toxinproben in Petrischalen, mit und ohne Deckel, sowie in mit Gummistopfen verschlossenen Babyflaschen wurden dem Licht einer 100 Watt-Glühbirne exponiert. In der Versuchsebene - ein Meter Abstand zur Glühbirne - wurde eine Temperatur von 28°C gemessen. Der Versuchsraum war gegen äußere Einflüsse abgeschirmt. Die relative Luftfeuchte lag über die gesamte Versuchsdauer bei 52-56 %.

- Reihe 1: In fünf Petrischalen wurden je 10,0 ml enterotoxinhaltigen Kulturfiltrats (7,0 mcg/ml) gegeben. Die verschlossenen Schalen blieben 72 Stunden lang unverändert dem Licht ausgesetzt. Der Verdunstungsverlust (ca 40 %) wurde bei Versuchsende mit physiologischer Kochsalzlösung ergänzt.
- Reihe 2: Die Versuchsbedingungen blieben nahezu unverändert, nur wurden die Petrischalen nicht abgedeckt. Innerhalb eines Tages verdunstete die Probenflüssigkeit. Der Rückstand wurde bei Versuchsende in 10,0 ml physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt.
- Reihe 3: Zwei Babyflaschen wurden mit je 100 ml Kulturfiltrat (7,0 mcg

Enterotoxin/ml) beschickt, verschlossen und sieben Tage lang dem Licht ausgesetzt. Im Abstand von 24 Stunden wurden aus jeder Flasche Proben zu je 1,0 ml entnommen und eingefroren. Bei Versuchsende wurde die serologische Restaktivität der 14 Proben mit zwei lichtgeschützt aufbewahrten Kontrollproben verglichen.

2.2. Austrocknung

2.2.1. Austrocknung bei Zimmertemperatur

Acht Petrischalen wurden mit je 10 ml verdünnten Kulturfiltrates mit 7,0 mcg Enterotoxin/ml beschickt. Vier dieser Petrischalen wurden in einen Raum mit einer Temperatur von 18°C und 50 % relativer Luftfeuchte verbracht, die restlichen vier in einen zweiten Raum mit 21°C und 60 % relativer Luftfeuchte. Die Petrischalen blieben jeweils unverschlossen über 72 Stunden in diesen Räumen stehen. Der Verdunstungsverlust wurde bei Versuchsende mit physiologischer Kochsalzlösung ersetzt.

2.2.2. Austrocknung im Brutschrank

Für jede Versuchsreihe wurden fünf Petrischalen vorgewärmt. Sie wurden bei Versuchsbeginn mit je 10 ml Kulturfiltrat mit 7,0 mcg Enterotoxin B/ml beschickt und unverschlossen in einen Brutschrank gestellt. Nach Versuchsende wurde der Rückstand in jeder Petrischale in 10 ml physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt. Die Toxinbeeinflussung durch die Austrocknung wurde im Brutschrank bei folgenden Temperatur-Zeit-Kombinationen geprüft:

- Reihe 1: 30°C über 6 Stunden
- Reihe 2: 30°C über 72 Stunden
- Reihe 3: 40°C über 6 Stunden
- Reihe 4: 40°C über 72 Stunden
- Reihe 5: 50°C über 6 Stunden
- Reihe 5: 50°C über 72 Stunden

Die Möglichkeit einer Reaktivierung wurde geprüft, indem die erwärmten Kulturfiltrate anschließend sechs Minuten gekocht wurden (JAM-LANG u. a., 1971) beziehungsweise 24 Stunden bei 25°C gelagert wurden (FUNG u. a., 1973), bevor sie ein zweites Mal im MANCINItest angesetzt wurden.

3. Wirkung verschiedener Temperatureinflüsse auf die Stabilität von Enterotoxin B

3.1. Temperaturen unter -10°C

Um den Einfluß des Gefrierens auf die serologische Aktivität festzustellen, wurden 14 Proben mit Kulturfiltrat (70 mcg Enterotoxin/ml) zu je 1,0 ml in verschließbare Reagiergefäße abgefüllt (Reihe 1). Für eine zweite Reihe mit ebenfalls 14 Proben wurde das Kulturfiltrat mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt (7,0 mcg Enterotoxin B/ml) und ebenfalls in Mengen zu 1,0 ml in Reagiergefäße gegeben. Die beschrifteten Reagiergefäße wurden anschließend bei -12°C in einer Tiefkühltruhe eingefroren. Von beiden Reihen wurden im Abstand von 30 Tagen jeweils zwei Proben entnommen, im Wasserbad bei 20°C aufgetaut und sofort im MANCINItest geprüft. Außerdem wurden zwei Proben mit 70 mcg Enterotoxin B/ml und zwei mit 7,0 mcg/ml über die gesamte Versuchsdauer (210 Tage) im Abstand von 30 Tagen 20 Minuten lang im Wasserbad bei 20°C aufgetaut und anschließend sofort wieder eingefroren (Reihe 3). In einer vierten Versuchsreihe wurden insgesamt vier Proben zu je 10,0 ml Kulturfiltrat (zwei mit 70,0 und zwei mit 7,0 mcg Enterotoxin/ml) in verschlossenen Plastikreagenzgläsern 210 Tage bei -12°C gelagert.

Schließlich wurde lyophilisiertes Kulturfiltrat mit jeweils 700 mcg Enterotoxin in sieben Reagenzgläsern bei -20°C aufbewahrt (Reihe 5). Über sieben Monate hin wurde alle 30 Tage eine Probe entnommen. Das Lyophilisat wurde jeweils in 100,0 ml physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt und anschließend mit derselben Lösung 1:7 verdünnt. Diese Verdünnungsstufe wurde im MANCINItest direkt mit der serologischen Aktivität des Referenztoxins (1,0 mcg/ml) verglichen.

3.2. Kühlschranktemperatur

Um festzustellen, ob die serologische Aktivität eines Enterotoxin-kulturfiltrates bei Kühlschranktemperatur (4°C) abnimmt, wurden zwei verschiedene Versuchsanordnungen festgelegt.

Einmal wurde in ein 250 ml Becherglas 100 ml Kulturfiltrat (70,0 mcg Enterotoxin/ml) eingefüllt. Das Becherglas wurde anschließend nur mit Gaze abgedeckt. So im Kühlschrank aufbewahrt, erfolgte eine Probeentnahme 30 Tage lang alle 48 Stunden. Jeweils zweimal 1,0 ml wurden entnommen, 1:70 verdünnt (physiologische Kochsalzlösung) und im MANCINItest mit dem Referenztoxin (1,0 mcg/ml) verglichen. Der Flüssigkeitsverlust durch die Verdunstung wurde vernachlässigt, da nach 30 Tagen 69 ml statt der errechneten 70 ml vorhanden waren und die Differenz also weniger als 1,5 % betrug.

Die zweite Versuchsreihe verlief als Langzeitversuch über 210 Tage. Luftdicht verschlossene Reagenzgläser mit jeweils 10,0 ml Kulturfil-

trat (einerseits mit 70,0, andererseits mit 7,0 mcg Enterotoxin/ml, letzteres verdünnt in physiologischer Kochsalzlösung) wurden bis zu 210 Tage lang im Kühlschrank aufbewahrt. Während der ersten 90 Tage wurde alle 10 Tage eine Probe zur Bestimmung der augenblicklichen Toxizität entnommen. Anschließend erfolgte die Probenentnahme nur noch in monatlichen Abständen (jeweils unverdünntes und verdünntes Kulturfiltrat).

3.3. Zimmertemperatur

Temperaturen zwischen 18°C und 27°C wirkten über einen Zeitraum von 210 Tagen auf luftdicht abgeschlossene Kulturfiltratproben von je 10,0 ml mit einer Ausgangsaktivität von 70,0 mcg Enterotoxin/ml ein. Die Probeentnahme erfolgte bis zum zehnten Tag alle 24 Stunden, dann am zwanzigsten und am dreißigsten Tag sowie anschließend nur noch jeden dreißigsten Tag.

3.4. Erwärmung im Brutschrank auf 50°C

Um bei möglichst konstanten Bedingungen reproduzierbare Ergebnisse zu erreichen, wurde die serologische Aktivität von enterotoxinhaltigen Kulturfiltraten, die bei 50°C (± 1) im Brutschrank eingelagert waren, nach 12, 24, 48 und 72 Stunden in drei Parallelansätzen bestimmt.

Die Ausgangskonzentration des mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnten Kulturfiltrates lag bei 7,0 mcg Enterotoxin/ml. Es wurde in Mengen zu je 100 ml in drei Babyflaschen (Fassungsvermögen 200 ml) abgefüllt, die mit Gummistopfen verschlossen wurden. Für eine weitere Versuchsreihe wurde eine feuchte Kammer mit sechs Petrischalen mit Deckeln eine Stunde lang im Brutschrank bei gleicher Temperatur vorgewärmt. Anschließend wurde jede Petrischale mit 10,0 ml Kulturfiltrat (7,0 mcg/ml) beschickt und wieder verschlossen. Nach 24, 48 und 72 Stunden wurden je zwei Petrischalen entnommen. Der Flüssigkeitsverlust der feuchten Kammer wurde täglich mit vorgewärmtem Aqua destillata ersetzt. Bei den Proben selbst trat keine meßbare Volumenabnahme ein.

3.5. Erwärmung im Wasserbad

Die Temperaturkonstanz des Wasserbades wurde mit einem Thermometer eine Stunde lang in fünfminütigen Abständen kontrolliert. Daraus ergab sich eine maximale Abweichung. Diese belief sich bei 55-70°C auf jeweils $\pm 0,5^\circ\text{C}$, bei den höheren Temperaturen auf $\pm 1,0^\circ\text{C}$.

Vor jedem Erhitzungsversuch wurde die benötigte Anzahl dünnwandiger Reagenzgläser im Wasserbad vorgewärmt. Die erwärmten Reagenzgläser wurden mit einer Repetierspritze (Hauptner, Muto-Express) beschickt, weil das quantitative Einfüllen der gewünschten Filtratmenge (5,0 ml) so am schnellsten und genauesten vorgenommen werden konnte. Sofort nach dem Beschicken der Reagenzgläser wurden diese verschlossen. Die Versuchsdauer wurde mit einer Handstoppuhr kontrolliert. Nach Versuchsende wurden die Reagenzröhrchen umgehend in Eiswasser abgekühlt.

Mit dem von JAMLANG u. a. (1971) beschriebenen Verfahren - sechsminütiges Erhitzen der Proben auf 99°C - wurde jeweils anschließend geprüft, ob es zu einer Reaktivierung des inaktivierten Enterotoxins gekommen war.

Reihe 1: Jeweils zwei Proben (7,0 mcg Enterotoxin/ml) wurden im Wasserbad bei 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 bzw. 99°C eine halbe Stunde erwärmt.

Reihe 2: Die Toxinkonzentration und die Erwärmungstemperaturen blieben unverändert. Die Erhitzungsdauer wurde auf eine Stunde ausgedehnt.

Reihe 3: Die Erhitzung erstreckte sich über eine bis vier Stunden. Die Erhitzungstemperaturen waren 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 bzw. 99°C. Die Toxinkonzentration betrug 7,0 mcg/ml.

Reihe 4: Die Toxinkonzentration wurde auf 0,7 mcg Enterotoxin/ml verringert. Die Erhitzungsdauer war eine Stunde. Folgende Temperaturgrade wurden gewählt: 60, 70, 80, 90 bzw. 99°C.

Reihe 5: Kulturfiltrat (mit 70,0 mcg Enterotoxin/ml) wurde mit rekonstituierter Trockenmagermilch (1 g auf 10 ml Leitungswasser) so verdünnt, daß die Enterotoxinkonzentration des Mediums 7,0 mcg/ml betrug. Erhitzt wurde eine Stunde lang bei 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 bzw. 99°C.

Reihe 6: Kulturfiltrat wurde ebenfalls wie in Reihe 5 mit rekonstituierter Trockenmagermilch verdünnt, allerdings auf eine Toxinkonzentration von 0,7 mcg/ml. Erhitzt wurde eine Stunde lang bei 60, 70, 80, 90 bzw. 99°C.

3.6. Destillation

Im Vorversuch wurden 250 ml verdünntes Kulturfiltrat in einem Kugelkolben über einem Ölbad (Öltemperatur 130°C) bis zum Siedepunkt erhitzt. Der sich bildende Wasserdampf wurde in einem Plastikschauch zum Kühler geleitet, kondensiert und schließlich in ein Auffangglas abgeschieden. Da bis zum vollständigen Verdampfen der Flüssigkeit mehr als eine Stunde verging, und damit eine ins Gewicht fallende Hitzeeinwirkung auf das enterotoxinhaltige Kulturfiltrat unabdingbar war, wurde die Versuchsanordnung mehrfach modifiziert.

Der endgültige Versuchsaufbau (Abbildung 1) war so ausgelegt, daß die Hitzeeinwirkung so kurz wie möglich blieb und ein möglicher De-

toxifizierungseffekt überwiegend durch den Destillationsvorgang bedingt wurde: Aus einem Vorratsbehälter, der einen Meter über einem zweihälsigen Kugelkolben befestigt war, floß das Kulturfiltrat über einen Plastikschlauch in diesen Destillationskolben. Der Höhenunterschied von einem Meter erwies sich als notwendig, da sonst der Dampfdruck im Destillationskolben das Nachtropfen des Filtrates verhinderte. Als "Einspritzdüse" wurde eine dünn ausgezogene Pasteurpipette verwendet, über deren dickerem Ende der Plastikschlauch gestülpt war. Kolbenhals und Pipette waren mit einem passenden Gummistopfen abgedichtet. Vom zweiten Kolbenhals wurde der anfallende Wasserdampf in einem Halb-Zoll-Plastikschlauch in einen als Abscheider ausgelegten Kühler eingeleitet. Als Kühler diente wiederum ein Kugelkolben mit zwei Hälsen. Das entstehende Kondensat bildete im Kühler einen Flüssigkeitsspiegel, in den ein Steigrohr eintauchte. In diesem Steigrohr wurde das Kondensat durch den Dampfdruck nach oben in ein Auffanggefäß gedrückt, konnte jedoch nicht wieder in den Destillationskolben zurückgesaugt werden.

Mit einer Schlauchklemme, die am Gummischlauch zwischen Vorratsbehälter und Düse angebracht war, konnte die Tropfenzahl so reguliert werden, daß etwa 100 Tropfen pro Minute im Kugelkolben auftrafen. Auf diese Weise konnte sich kein Flüssigkeitsspiegel bilden, weil die Tropfen sofort verdampften. Die Ölbad-Temperatur konnte auf 120°C gesenkt werden. Die effektive Erhitzungszeit wie auch der Erhitzungsgrad wurden dadurch so gering wie möglich gehalten. Die Leistung dieser Destillationsanlage lag mit ungefähr 230 ml/h nur knapp unter der im Vorversuch betriebenen Anlage.

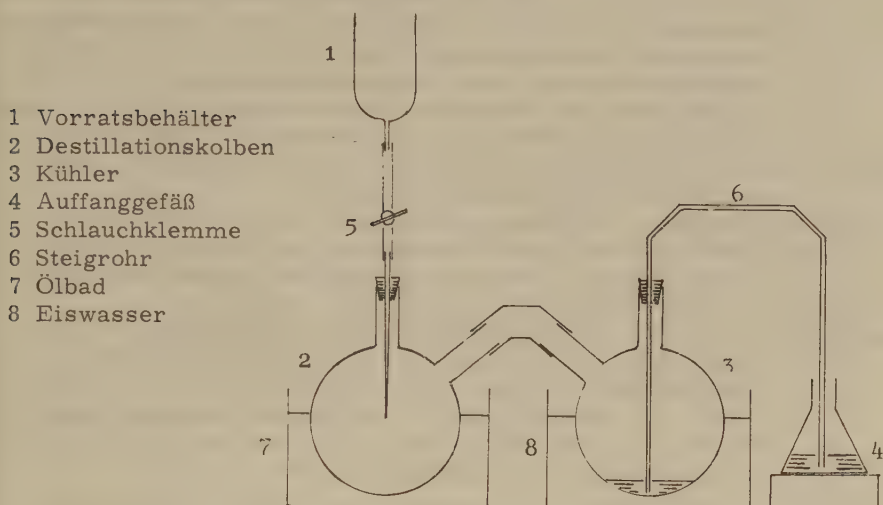
Reihe 1: 500 ml Kulturfiltrat mit 7,0 mcg Enterotoxin pro ml wurden in 135 Minuten destilliert.

Reihe 2: 250 ml Kulturfiltrat (70,0 mcg/ml) wurden in 67 Minuten destilliert.

Das Destillat - bei Reihe 2 auch hundertfach konzentriert (Ultrafiltration) - wurde nach Versuchsende auf seine serologische Aktivität ausgetestet. Außerdem wurden jeweils 10 ml Destillat sechs Minuten auf 99°C erhitzt bzw. 24 Stunden bei 25°C gelagert, um festzustellen, ob es zu einer Reaktivierung kommt.

Der Niederschlag im Destillationskolben wurde bei der ersten Versuchsreihe mit 50 ml und bei der zweiten mit 20 ml physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt; dieser Lösungsvorgang mußte allerdings mechanisch unterstützt werden. Die serologische Aktivität dieser Niederschlagsaufschwemmungen wurde ebenfalls bestimmt. Abschließend wurden 100 ml Destillat der Versuchsreihe 2 auf ihre biologische Wirkung im Selbstversuch geprüft.

Abbildung 1: Versuchsanordnung zur Untersuchung des Einflusses der Destillation auf die serologische Aktivität von Rohenterotoxin B (Kulturfiltrat)



4. Ultraschall

Bei der Ultraschallbehandlung der enterotoxinhaltigen Kulturfiltrate wurde der Sonifier-Ultraschalldesintegrator (Branson; Modell B-12) benützt.

Entsprechend der Arbeitsanleitung des Geräteherstellers wurden die Kulturfiltrate im Reagenzglas - mit der Mikrospitze (Reihe 1, 2, 5 und 6); im Becherglas - mit der Arbeitsspitze mit Kegelaufsatz (Reihe 3) bzw. im Durchfluß - mit dem Durchflußresonator (Reihe 4) beschallt.

Reihe 1: In Reagenzgläsern in Mengen zu 5 ml abgefüllte Kulturfiltrate (7,0 mcg Enterotoxin/ml) wurden drei beziehungsweise fünf Minuten beschallt (Beschallungsintensität: Position 1 bis 7). Da es bei der Beschallung zu einer Erwärmung des Kulturfiltrates bis auf 80°C kam, wurde mit Eiswasser gekühlt.

Reihe 2: Abweichend von Reihe 1 wurde nur in Position 6 beschallt und zwar über 5, 10, 15, 20, 25 bzw. 30 Minuten.

Reihe 3: In Bechergläsern in Mengen zu je 100 ml abgefüllte Kulturfiltrate (7,0 mcg Enterotoxin pro ml) wurden zehn Minuten lang in Position 8, 9 bzw. 10 beschallt. Die Erwärmung des Filtrates auf etwa 40°C wurde nicht verhindert.

- Reihe 4: 2000 ml eines Kulturfiltrates mit 52 mcg Enterotoxin/ml wurden im Durchfluß bei Stufe 9 beschallt. Die Position 9 wurde gewählt, da hier das satt-dumpfe Arbeitsgeräusch auftrat, das nach Angaben des Herstellers optimale Beschallung sichert. Das Kulturfiltrat floß aus einem Vorratsbehälter durch einen Gummischlauch in den Durchflußaufsatz des Ultraschallgeräts. Mit einer Schlauchklemme wurde die Flüssigkeitszufuhr so gesteuert, daß eben noch ein kontinuierliches Sprühen auftrat (6000 ml/h). Am Auslaß des Durchflußresonators wurde die feinversprühte Flüssigkeit in einem 2000 ml Erlenmeyer-Enghalskolben aufgefangen.
- Reihe 5: 5 ml eines 1:10 mit homogenisierter Vollmilch verdünnten Kulturfiltrates (Toxinendkonzentration: 7,0 mcg/ml) wurden in Reagenzgläsern fünf Minuten beschallt (Beschallungsintensität: Position 1 bis 7).
- Reihe 6: Beschalltes Medium und Toxinendkonzentration wurden gegenüber Reihe 5 nicht verändert. Das Kulturfiltrat wurde im Reagenzglas (5 ml) über 5, 10, 15, 20, 25 bzw. 30 Minuten (Position 7) beschallt. Die Proben wurden wie in den anderen Reagenzglas-Versuchsreihen in Eiswasser gekühlt, um den Einfluß einer Erwärmung auszuschalten.

5. Adsorption an Aktivkohle

In zwei Vorversuchen wurde die Fähigkeit, Enterotoxin B aus Kulturfiltraten zu adsorbieren, von Aktivkohlegranulat (gekörnt 1,5 mm; Merck) mit der von Aktivkohlestaub (Darco G 60; Serva) verglichen. Im ersten Vorversuch wurde Kulturfiltrat im Durchflußverfahren durch einen "Aktivkohlefilter" gegeben. Im zweiten Vorversuch wurde dem Kulturfiltrat Aktivkohle zugesetzt und beides miteinander verrührt. Nach einer zuvor festgelegten Einwirkungszeit wurde die Mischung wie im ersten Vorversuch durch einen Papierfaltenfilter gegossen und so Aktivkohle von der Flüssigkeit getrennt. Da das Granulat jeweils geringere Toxinmengen adsorbierte, wurde der Hauptversuch nur mit Aktivkohlestaub (Darco G 60) durchgeführt.

Reihe 1: 42 g Aktivkohlestaub wurden in einen Papierfaltenfilter gegeben. 1000 ml Kulturfiltrat (7,0 mcg Enterotoxin/ml) wurden zugegeben und filtriert. Der eigentliche Filtriervorgang dauerte etwa 20 min, allerdings tropfte auch nach zwei Stunden noch immer etwas Flüssigkeit aus dem Filter ab. Das Filtrat wurde im MANCINITest auf seine serologische Aktivität getestet.

Reihe 2: Derselbe Versuch wurde mit Kulturfiltrat mit 0,7 mcg Enterotoxin/ml durchgeführt. Vor der Bestimmung der serologischen Aktivität wurden 100 ml des Filtrates mittels Ultrafiltration 100:1 konzentriert. 500 ml des Filtrates wurden außerdem im Selbstversuch auf ihre biologische Aktivität geprüft.

- Reihe 3: Abweichend von Reihe 1 wurde die Aktivkohle dem Kulturfiltrat zugesetzt. Nach 15 Minuten Rühren mit einem Magnetrührer wurde die Mischung durch einen Papierfaltenfilter gegossen und das Filtrat wiederum im MANCINITest geprüft.
- Reihe 4: Um die Adsorptionskapazität von Aktivkohlestaub für Enterotoxin B Kulturfiltrat abschätzen zu können, wurde auf das "Filtermodell" der Reihe 1 zurückgegriffen. Insgesamt 5000 ml Kulturfiltrat (7,0 mcg/ml) wurden filtriert. Nach jeweils 100 ml wurde eine Probe von 1,0 ml direkt am Filterausgang entnommen. Das ergab insgesamt 49 Proben (ca 100 ml Kulturfiltrat wurden von der Aktivkohle zurückgehalten). Fünf weitere Proben wurden aus jeweils zu 1000 ml (bzw. einmal 900 ml) gepooltem Filtrat entnommen. Schließlich wurde nach kräftigem Durchmischen aus dem Gesamtfiltrat, das durch Zusammengießen aller Filtrate gewonnen wurde, eine Probe genommen. Das Gesamtfiltrat wurde anschließend noch einmal durch die gleiche Aktivkohle filtriert. Aus dem dabei erhaltenen Gesamtfiltrat wurde ebenfalls eine Probe gezogen.

6. Nachweisverfahren

Der Nachweis von Enterotoxin B erfolgte bei den unbehandelten wie auch den einer physikalischen Einwirkung unterworfenen Kulturfiltraten qualitativ und semiquantitativ mit dem OUCHTERLONYtest in Anlehnung an das von SOMMERFELD und TERPLAN (1975) beschriebene Verfahren bzw. quantitativ mit dem von MANCINI u. a. (1965) entwickelten Verfahren der einfachen radialen Immunodiffusion.

6.1. OUCHTERLONYtest (Radiale Doppeldiffusion)

Dieses Nachweisverfahren wurde zuerst von OUCHTERLONY (1948) beschrieben. Der Test beruht darauf, daß Antigen und Antikörper vom jeweiligen Reservoir aus radiär in ein Gel diffundieren. Treffen Antigen und homologer Antikörper aufeinander, bildet sich ein Antigen-Antikörper-Komplex, der als Präzipitationslinie sichtbar wird. Für die eigenen Versuche wurde die modifizierte Methode nach SOMMERFELD und TERPLAN (1975) angewandt. Mit 10 ml eines verflüssigten 1 %igen Agarosegels (0,02 m Barbitalpuffer mit Zusatz von 1 % Polyäthylenglykol 2000, pH 8,4) wurden in einem Guß drei Objektträger, die in einem Rahmen (LKB-Immunophor-Ausrüstung) eingelegt waren, beschichtet. Aus der zwei Millimeter hohen Gelschicht wurden nach dem Erstarren mit einer Stanzform Löcher in der gewünschten Anordnung ausgestanzt und mit jeweils 7 µl Kulturfiltrat oder Enterotoxin B bzw. Antiserum B (Serva) randvoll gefüllt. Nach einer Reaktionszeit von 18 bis 24 Stunden in einer feuchten Kammer

bei 37°C wurden die Platten unter feuchten Filterpapierstreifen bei 37 bis 50°C getrocknet (3 bis 4 Stunden). Die Färbung (3 bis 5 Minuten) erfolgte mit 0,5 % Coomassie-Brillant-Blau gelöst in Wasser, Eisessig (10 %) und Methanol (45 %). Nach dem Entfärben (5 bis 10 Minuten) in einer Lösung, die 250 ml Methanol und 100 ml Eisessig und 450 ml Aqua destillata enthielt, wurden die Platten etwa 15 Minuten im Brutschrank getrocknet, bevor sie ausgewertet wurden.

Da sich nach SOMMERFELD und TERPLAN (1975) das diagonale Lochmuster zur halbquantitativen Feststellung von Toxingehalten empfiehlt, wurde diese Anordnung gewählt. Die Löcher der mittleren Reihe enthalten dabei alle Antiserum derselben Konzentration. Werden zwei Löcher der oberen bzw. unteren Reihe - in der Regel jeweils das mittlere - mit Referenztoxin bekannter Konzentration beschickt, können auf einem Objektträger maximal acht Proben qualitativ oder eine bzw. zwei Verdünnungsreihen einer bzw. zweier Proben mit unbekanntem Toxingehalt qualitativ und semiquantitativ untersucht werden. Die Nachweisgrenze liegt bei etwa 0,1 mcg/ml Enterotoxin B.

6.2. MANCINItest (einfache radiale Immunodiffusion)

Für dieses von MANCINI u. a. (1965) entwickelte quantitative Verfahren wurden 7,25 ml auf 60°C abgekühlte Agarose (0,02 m Barbitall-Puffer ohne Polyäthylenglykol, pH 7,4) mit 0,25 ml Antiserum B (eigene Produktion) vermischt. Dieses homogene Gemisch reichte zur Beschichtung eines Objektträgers (7,5 cm x 5,2 cm), der in einen entsprechenden Rahmen eingelegt war (Nivelliertisch). Nach Erstarrung des Agarosegels konnten die Platten in einer feuchten Kammer im Kühlschrank aufbewahrt werden. Bei der beschriebenen Lagerung waren MANCINI-Platten noch nach zehn Tagen ohne Einschränkung der Antiserumaktivität zu verwenden.

In die erstarrte, 2 mm dicke Gelschicht wurden je nach erwartetem Toxingehalt 14 bis 24 Löcher gestanzt. Von den randvoll gefüllten (7 µl) Probelöchern aus diffundieren die Toxinmoleküle radial in die Gelschicht und bilden ringförmige Präzipitate. Bei den eigenen Versuchen wurde eine Reaktionszeit von 18 Stunden gewählt (feuchte Kammer, Zimmertemperatur, Nivelliertisch).

Nach Trocknen, Färben und Entfärben - wie im OUCHTERLONYtest - wurden die Präzipitate ausgewertet. Der Durchmesser der kreisförmigen Präzipitate ist proportional der Toxinkonzentration.

In Vorversuchen wurden die Präzipitate von hochgereinigtem Enterotoxin B (Serva) verschiedener Konzentrationen ausgemessen, das einerseits in physiologischer Kochsalzlösung gelöst wurde, andererseits in 4%igem PHP-Medium. Da sich die Präzipitaddurchmesser für Toxinkonzentrationen über 2 mcg/ml nicht deckten, wurde die endgültige Eichkurve anhand von Kulturfiltratverdünnungsreihen aufgestellt.

Nach Abschätzung der Enterotoxinkonzentration eines Kulturfiltrates anhand einer Eichkurve für in physiologischer Kochsalzlösung gelöstes Enterotoxin wurde es so verdünnt, daß Enterotoxin B etwa in folgenden errechneten Endkonzentrationen zu erwarten war: 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9; 1,0; 1,1; 1,2; 1,3; 1,4 bzw. 1,5 mcg/ml. Im vierfachen Ansatz wurden die Präzipitaldurchmesser dieser geschätzten Konzentrationen mit dem des Referenztoxins (1,0 mcg Enterotoxin B/ml) verglichen. Durch Interpolieren wurde dann die tatsächliche Toxinkonzentration des Kulturfiltrates ermittelt.

Durch Verdünnen dieses Kulturfiltrates bekannter Enterotoxinkonzentration mit physiologischer Kochsalzlösung wurden mehrere Verdünnungsreihen angelegt, insbesondere von 5 bis 0,15 mcg/ml. Im Bereich von 0,5 bis 5 mcg/ml Enterotoxin B war eine gute Übereinstimmung von Durchmesser der Präzipitate und Toxinkonzentration gegeben. Für Toxinkonzentrationen über 5,0 mcg/ml wurde der Diffusionsendpunkt innerhalb der Reaktionszeit nicht erreicht (SIMON, 1976). Während der Nachweis bei 0,3 mcg Enterotoxin/ml noch deutlich positiv verlief, war er bei Konzentrationen von 0,25 bis 0,15 mcg/ml nur schwach positiv (fraglich). Proben mit weniger als 0,15 mcg/ml wurden nicht erfaßt. Anhand der bei diesen Versuchen erzielten Werte wurde eine Eichkurve erstellt, mittels derer die Enterotoxinmengen/ml in den verschiedenen Versuchsreihen bestimmt wurden. Da bei jeder Platte vier Referenztoxinproben (1 mcg/ml) als interner Standard mitliefen, konnten plattenabhängige Unterschiede ausgeschaltet werden.

III. Ergebnisse

1. Wirkung natürlicher Umwelteinflüsse auf die Stabilität von Enterotoxin B

1.1. Sonnenlicht

Die in vier Reihen mit unterschiedlichen Versuchsanordnungen im Doppelansatz durchgeführten Tests zur Ermittlung des Einflusses von Sonnenlicht auf die serologische Aktivität von Enterotoxin B erstreckten sich jeweils über einen Zeitraum von 72 Stunden. Als Enterotoxin diente Rohtoxin wie es im Kulturfiltrat enterotoxinogener Staphylokokken vorliegt. Dieses wurde in Mengen zu 100 ml (7,0 mcg Enterotoxin pro ml) in 250 ml Bechergläser abgefüllt, bevor es dem Sonnenlicht ausgesetzt wurde.

Außentemperaturen während des Versuchs:

Uhrzeit ($\frac{^{\circ}\text{O}}{\text{O}}$)	6	8	10	12	14	16	18	20	22
1. Meßtag ($^{\circ}\text{C}$)	20	22	42	47	45	35	30	27	23
2. Meßtag ($^{\circ}\text{C}$)	20	21	40	46	46	35	29	26	22

Wenn der Verdunstung nicht Einhalt geboten wurde und das "Filtrat" bereits nach 24 Stunden trocken war, die Flüssigkeitsmenge aber erst nach 72 Stunden wieder auf 100 ml aufgefüllt wurde (Reihe 1), betrug die Restaktivität 72 % bzw. 69 %. Wenn der Flüssigkeitsverlust täglich dreimal ergänzt wurde (Reihe 2) beziehungsweise die Verdunstung durch Verschuß der Bechergläser mit Cellophan weitgehendst unterbunden wurde (Reihe 3), kam es zu erheblichen Toxizitätsabnahmen. Die serologische Restaktivität belief sich in diesen Fällen auf etwa 10 % (Reihe 2) beziehungsweise 15-20 % (Reihe 3). Die mit einer Glasplatte abgedeckten Toxinproben (Reihe 4) hatten etwas mehr als die Hälfte ihrer Anfangsaktivität verloren. Die Restaktivitäten lagen bei 3,3 mcg/ml (47 %) und 3,1 mcg/ml (44 %). Die "Reaktivierung nach JAMLANG" (sechsinuitiges Kochen) wie auch die "Reaktivierung nach FUNG" (24 Stunden bei 25°C) bewirkten in keiner der Proben eine Veränderung der Restaktivität.

1.2. Sonnenwärme

Bei den zwei Versuchsreihen wurden jeweils 10 ml Kulturfiltrat mit 7,0 mcg Enterotoxin/ml in offenen Petrischalen dem Sonnenlicht indirekt ausgesetzt. Die direkte Bestrahlung wurde durch eine Abschirmung mit Dachpappe verhindert.

Temperaturverlauf gemessen im Würfelinnern:

Uhrzeit ($\frac{00}{00}$)	6	8	10	12	14	16	18	20	22
1. Meßtag ($^{\circ}\text{C}$)	21	29	45	51	49	41	35	30	27
2. Meßtag ($^{\circ}\text{C}$)	20	28	45	50	50	43	36	31	27

Unabhängig vom Versuchsbeginn - acht Uhr morgens oder zwölf Uhr mittags - waren die Proben innerhalb weniger Stunden eingetrocknet. Der Rückstand wurde am Versuchsende in 10 ml physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt. In beiden Reihen blieb eine hohe Restaktivität - 76 bis 73 % - erhalten.

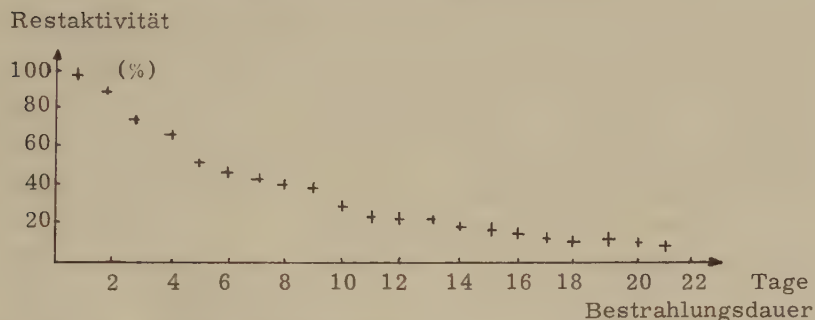
2. Wirkung simulierter Umwelteinflüsse auf die Stabilität von Enterotoxin B

2.1. Strahlen

2.1.1. UV-Strahlen

Bei der sich bis zu 21 Tage erstreckenden UV-Bestrahlung von Kulturfiltrat mit 7,0 mcg Enterotoxin/ml (Reihe 1) war eine stetig abnehmende serologische Restaktivität festzustellen. Sie betrug zum Beispiel am siebten Tage noch etwa 50 % und belief sich am Versuchsende auf ca 10 % (Schaubild 1).

Schaubild 1: Einfluß von UV-Strahlen auf die serologische Aktivität von Rohenterotoxin B (Kulturfiltrat mit 7,0 mcg/ml) bei 60 % relativer Luftfeuchte.

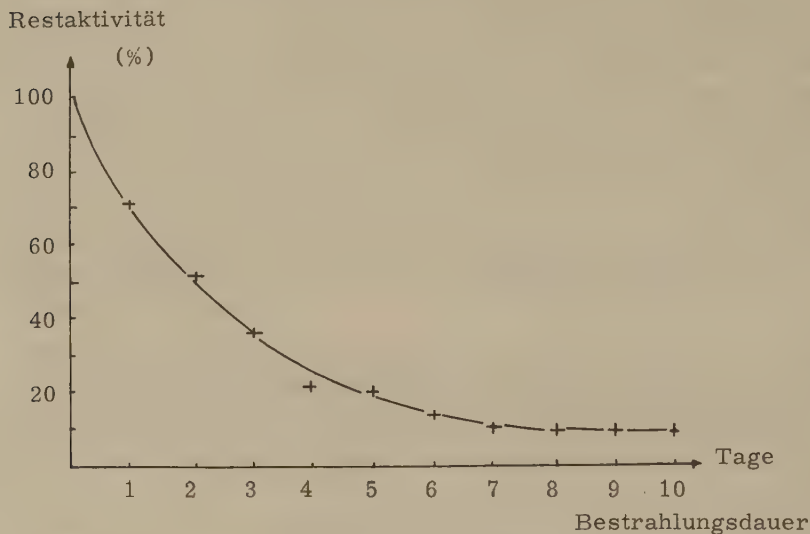


Bei der geringeren Konzentration (0,7 mcg/ml) wurden ähnliche Ergebnisse registriert. Die Restaktivität lag nach dem ersten Tag bei 95 % und nach 48 Stunden bei 79 %; nach dem dritten Tag wurden nur noch weniger als 0,5 mcg/ml (70 %) nachgewiesen. Bis zum zwölften Versuchstag blieb der serologische Nachweis im MANCINItest positiv, ab dem 13. Tag war er negativ (Reihe 2).

Wenn die UV-Bestrahlung in einer feuchten Kammer durchgeführt wurde (Reihe 3), kam es erheblich schneller zu einer hohen Inaktivierungsrate. So waren zum Beispiel von der Anfangskonzentration von 7,0 mcg/ml nach einem Tag nur noch 4,9 mcg/ml (70 %) nachzuweisen und nach zwei Tagen nur noch 3,5 mcg/ml (50 %). Die weiteren Ergebnisse sind im Schaubild 2 aufgezeichnet.

Die Aktivität des Lyophilisates (Reihe 4) blieb während der ersten sieben Tage unverändert. Nach 14 Tagen wurden noch 81 und 84 % Restaktivität ermittelt, während die zwei Proben, die 21 Tage bestrahlt wurden, zu 32 bzw. 36 % inaktiviert waren.

Schaubild 2: Einfluß von UV-Strahlen auf die serologische Aktivität von Rohenterotoxin B (Kulturfiltrat mit 7,0 mcg/ml) bei 100 % relativer Luftfeuchte.



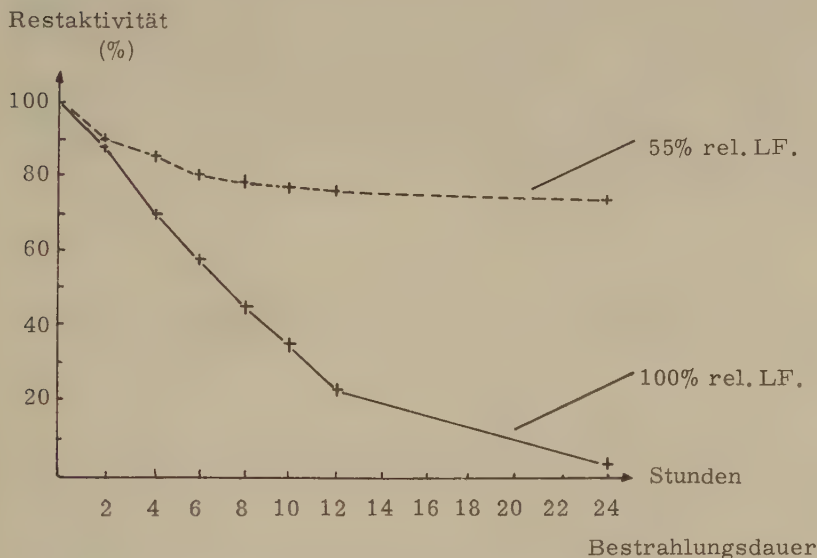
2.1.2. IR-Strahlen

Bei der Infrarotbestrahlung in der feuchten Kammer (relative Luftfeuchte: 100 %) wurden die fünffach angesetzten Kulturfiltrate (7,0 mcg Enterotoxin B/ml) innerhalb von 24 Stunden soweit inaktiviert, daß keine serologische Aktivität mehr nachzuweisen war. Der Toxizitätsabfall lag damit bei über 95 % (Reihe 1).

Bei der Infrarotbestrahlung im freien Raum (relative Luftfeuchte: 55 %) waren die Proben nach etwa fünf Stunden grobsinnlich trocken (Reihe 2); die Aufschwemmung des Kulturfiltratrückstandes der einzelnen Proben nach der gesamten Bestrahlungsdauer (24 Stunden) in 10,0 ml physiologischer Kochsalzlösung hatte noch eine Restaktivität von etwa 5 mcg/ml. Das entspricht einer Aktivitätsabnahme von etwa 25 %.

Der Einfluß der relativen Luftfeuchte beziehungsweise der Austrocknung des Filtrates auf den Grad des Toxizitätsabfalles wurde bei der sich anschließenden Versuchsreihe 3 bestätigt. Danach war bereits nach vierstündiger Bestrahlung ein deutlicher Unterschied zu beobachten (Schaubild 3). Die bei Versuchsende registrierten Werte entsprachen denen der beiden vorhergegangenen Versuchsreihen.

Schaubild 3: Einfluß der relativen Luftfeuchte auf die serologische Aktivität von Rohenterotoxin B (Kulturfiltrat mit 7,0 mcg/ml) bei Infrarotbestrahlung.



Wenn das Kulturfiltrat den Infrarotstrahlen nicht in offenen Petrischalen, sondern in verschlossenen Babyflaschen (jeweils 100 ml mit 7,0 mcg Enterotoxin B/ml) ausgesetzt wurde, konnte nach 24 Stunden keine effiziente Abnahme der serologischen Aktivität festgestellt werden (Reihe 4). Die durchschnittlichen Detoxifizierungsraten für die folgenden Versuchstage beliefen sich auf 8 % (2 Tage); 17 % (3 Tage); 21 % (4 Tage); 53 % (5 Tage) und 67 % (6 Tage).

2.1.3. Sichtbares Licht

Das Licht einer 100 Watt-Glühbirne bewirkte keine Inaktivierung des im Kulturfiltrat enthaltenen Enterotoxins (7,0 mcg/ml). Dabei war es unerheblich, ob das Kulturfiltrat drei Tage in geschlossenen (Reihe 1) bzw. offenen (Reihe 2) Petrischalen oder sieben Tage in verschlossenen Babyflaschen (Reihe 3) dem Licht exponiert wurde.

2.2. Austrocknung

2.2.1. Austrocknung bei Zimmertemperatur

Weder bei 18° C (50 % relative Luftfeuchte) noch bei 21° C (60 % relative Luftfeuchte) trat innerhalb von 72 Stunden ein mit dem MANCINI-test meßbarer Aktivitätsverlust ein.

2.2.2. Austrocknung im Brutschrank

Der Einfluß der Austrocknung bei 30°C, 40°C oder 50°C auf in unverschlossene Petrischalen abgefülltes Kulturfiltrat mit 7,0 mcg Enterotoxin B/ml wurde nach sechs bzw. 72 Stunden getestet. Dabei zeigte sich, daß nur nach 72 Stunden bei 50°C (Reihe 6) eine statistisch gesicherte Toxizitätsabnahme - im Durchschnitt 9 % - zu registrieren war. In allen anderen Versuchsreihen war keine Inaktivierung zu beobachten. Eine Reaktivierung des inaktivierten Toxins (Reihe 6) war mit keinem der beiden angewendeten Verfahren (sechsminütiges Kochen bzw. 24 Stunden bei 25°C) zu erzielen.

3. Wirkung verschiedener Temperatureinflüsse auf die Stabilität von Enterotoxin B

3.1. Temperaturen unter -10°C

Bei den sich über 210 Tage erstreckenden Versuchen blieb die serologische Aktivität der Kulturfiltrate (70,0 mcg bzw. 7,0 mcg Enterotoxin/ml) und des Lyophilisates offenbar vollkommen erhalten.

Selbst die vier Proben Kulturfiltrat mit 70,0 mcg beziehungsweise 7,0 mcg Enterotoxin/ml, die insgesamt sieben Mal - im Abstand von jeweils einem Monat - eingefroren und wieder aufgetaut worden waren, wiesen noch die ursprüngliche Aktivität auf.

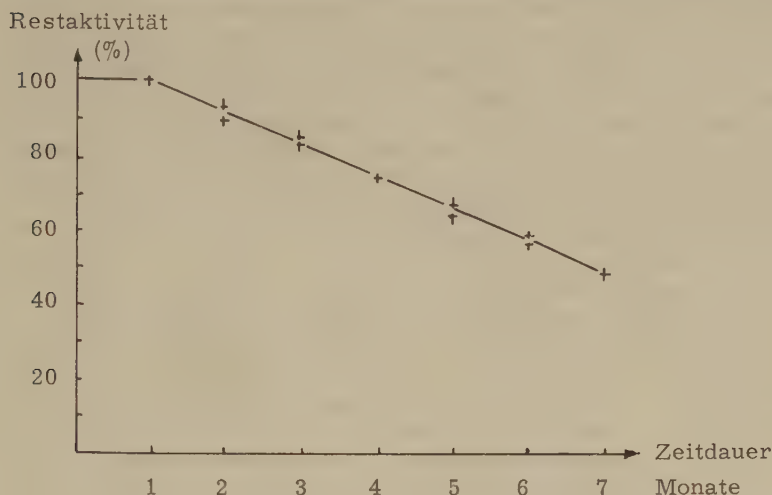
3.2. Kühlschrankschranktemperatur

Die Toxinkonzentration (70,0 mcg/ml) der nicht luftdicht verschlossenen Kulturfiltratprobe war nach 30 Tagen Kühlschrankschranklagerung unverändert. Bei den luftdicht verschlossenen Proben (70,0 bzw. 7,0 mcg/ml), die ebenfalls bei 4°C gelagert wurden, konnte selbst nach 210 Tagen kein Toxizitätsabfall festgestellt werden.

3.3. Zimmertemperatur

Die Toxinkonzentration (70,0 mcg/ml) der bei Zimmertemperatur (18°C - 27°C) aufbewahrten Kulturfiltratproben blieb bis zum 30. Tag unverändert. Anschließend kam es dann zu einer stetig zunehmenden Inaktivierung, so daß die serologische Restaktivität nach 210 Tagen nur noch 33,5 mcg/ml (48 %) betrug (Schaubild 4).

Schaubild 4: Einfluß der Zimmertemperatur auf die serologische Aktivität von Rohtoxin B (Kulturfiltrat mit 7,0 mcg/ml).



3.4. Erwärmung im Brutschrank auf 50°C

Die serologische Aktivität des in verschlossenen Babyflaschen abgefüllten Kulturfiltrates mit 7,0 mcg/ml Enterotoxin war nach zwölf Stunden noch unverändert. Nach 24 Stunden war eine Inaktivierungsrate von 7 % zu ermitteln, nach 48 Stunden eine solche von 9 % und nach 72 Stunden eine von 12 %. Die Versuche mit Petrischalen in einer feuchten Kammer (Versuchsreihe 2) erbrachten ähnliche Resultate.

3.5. Erwärmung im Wasserbad

Aus Tabelle 1 wie auch aus Schaubild 5 kann entnommen werden, daß die Erwärmung der 7,0 mcg Enterotoxin pro ml enthaltenden Kulturfiltrate auf 30°C, 40°C bzw. 50°C sowohl nach einer halben Stunde (Reihe 1) als auch nach einer Stunde (Reihe 2) keine Inaktivierung bedingte. Bei der Erwärmung auf 60°C betrug die Restaktivität noch 91 % (30 min) bzw. 55 % (60 min). Auffällig war, daß bei 70°C eine stärkere Abnahme der serologischen Aktivität zu verzeichnen war als bei 80°C, 90°C bzw. 99°C. Eine vollständige Inaktivierung wurde jedoch selbst nach 60 Minuten bei keiner der geprüften Temperaturstufen beobachtet.

Eine teilweise Reaktivierung inaktivierten Toxins war nach sechsmütigem Kochen (JAMLANG u. a., 1971) bei den auf 60, 70, 80 bzw. 90°C erhitzten Proben zu erkennen, nicht aber bei den auf 99°C erhitzten. Nach der Reaktivierung war die serologische Restaktivität um so kleiner je höher die Erhitzungstemperatur war.

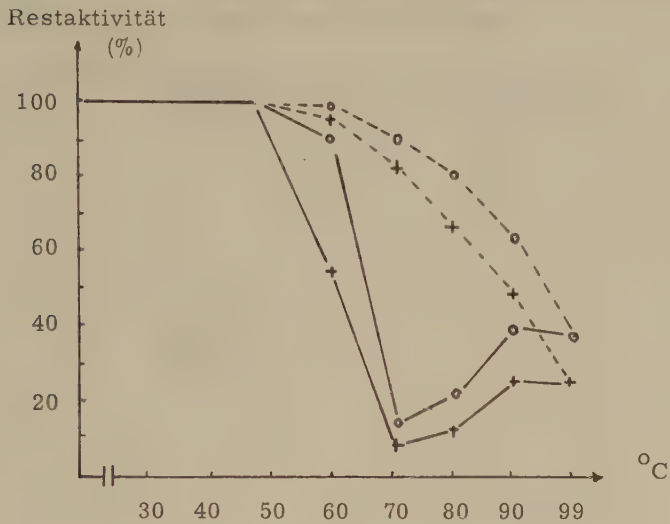
Aus den Ergebnissen der sich anschließenden Versuchsreihe 3 kann abgeleitet werden, daß die Inaktivierungsrate insbesondere bei Temperaturen von 60°C bis 70°C erheblich anstieg, wenn das Kulturfiltrat nicht nur 60 Minuten, sondern 120 Minuten oder länger erhitzt wurde (Tabelle 2). Der Verlust an serologischer Aktivität war wiederum bei 70°C am größten, und zwar sowohl nach 60 Minuten als auch nach 120, 180 bzw. 240 Minuten. Nach der teilweisen Reaktivierung des inaktivierten Toxins, die ebenfalls nur bei den auf 99°C erhitzten Kulturfiltraten nicht zu registrieren war, war der Einfluß der Erhitzungsdauer nicht mehr so stark ausgeprägt: Die Toxinverluste nahmen nur geringfügig zu (Tabelle 2).

Tabelle 1: Einfluß der Erhitzung auf die serologische Aktivität von Rohenterotoxin B (Kulturfiltrat mit 7,0 mcg/ml).

Temperatur (°C)	prozentuale Restaktivität			
	vor Reaktivierung		nach Reaktivierung	
	Erhitzungsdauer 30 min	Erhitzungsdauer 60 min	Erhitzungsdauer 30 min	Erhitzungsdauer 60 min
30	100	100	n. d.	n. d.
40	100	100	n. d.	n. d.
50	100	100	n. d.	n. d.
60	91	55	98	95
70	16	8	90	82
80	23	13	75	65
90	43	24	60	48
99	39	25	39	25

Zeichenerklärung: n. d. = nicht durchgeführt

Schaubild 5: Einfluß der Erhitzung auf die serologische Aktivität von Rohenterotoxin B (Kulturfiltrat mit 7,0 mcg/ml).



- vor Reaktivierung; 30 min Erhitzung
- +—+ vor Reaktivierung; 60 min Erhitzung
- - - - ○ nach Reaktivierung; 30 min Erhitzung
- + - - - + nach Reaktivierung; 60 min Erhitzung

Tabelle 2: Einfluß der Erhitzungsdauer auf die serologische Aktivität von Rohenterotoxin B (Kulturfiltrat mit 7,0 mcg/ml.

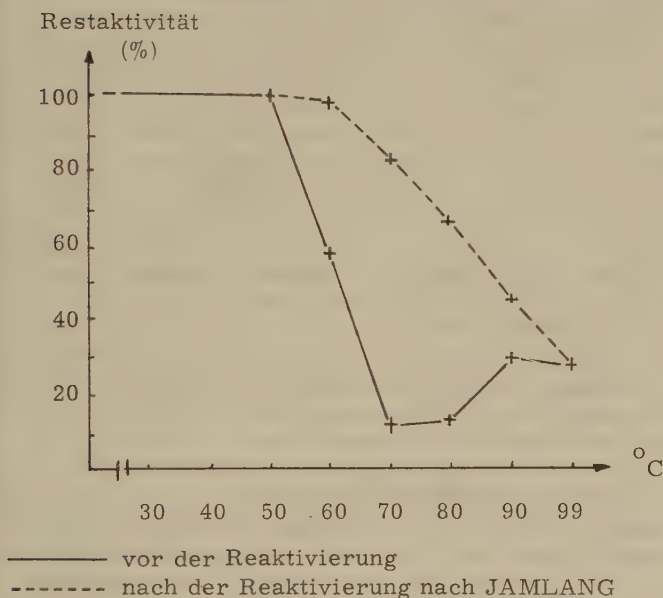
Temperatur (°C)	prozentuale Restaktivität							
	vor Reaktivierung (Erhitzungsdauer in Stunden)				nach Reaktivierung (Erhitzungsdauer in Stunden)			
	1	2	3	4	1	2	3	4
60	55	22	10	7	95	90	85	85
65	25	12	8	6	89	85	80	80
70	8	4	3	3	82	78	75	74
75	11	8	8	6	73	70	68	67
80	13	11	9	8	65	63	60	60
85	19	15	12	10	58	56	55	54
90	24	18	14	14	48	44	41	41
95	28	20	16	14	40	35	31	30
99	25	15	12	11	25	15	12	11

Bei den einstündigen Erhitzungsversuchen mit der geringeren Enterotoxinkonzentration von 0,7 mcg/ml (Reihe 4) wurden ähnliche Resultate erzielt. Nach einer Stunde Erhitzung bei 60, 70, 80, 90 bzw 99°C verlief der MANCINITest nur bei den auf 70°C erhitzten Proben negativ (weniger als 0,15 mcg/ml). Bei der Erwärmung auf 60 bzw. 90°C war besagter Nachweis positiv (>0,3 mcg/ml), bei 80°C sowie bei 99°C schwach positiv (0,25-0,15 mcg/ml). Auch hinsichtlich der Reaktivierung (sechsinütiges Kochen) wurden vergleichbare Ergebnisse wie in der vorhergehenden Versuchsreihe mit der größeren Enterotoxinkonzentration festgestellt.

Einstündige Erhitzungsversuche mit in rekonstituierter Trockenmilch verdünntem Kulturfiltrat (Endkonzentration 7,0 mcg/ml - Reihe 5 - bzw. 0,7 mcg/ml - Reihe 6) erbrachten ähnliche Resultate wie bei den mit Aqua destillata verdünnten Kulturfiltraten. Die serologische Aktivität war erst nach einer Erhitzung auf 60°C vermindert und bei einer solchen auf 70°C wieder stärker abgefallen als bei einer auf 90 bzw. 99°C. Nur bei der Erhitzung auf 80°C wurde ein annähernd hoher Aktivitätsverlust wie bei 70°C verzeichnet (Schaubild 6).

Eine teilweise Reaktivierung konnte auch hier - mit Ausnahme der auf 99°C erhitzten Proben - registriert werden. Insgesamt war die prozentuale Restaktivität nach Erhitzung etwas höher als bei den mit Aqua destillata verdünnten Kulturfiltraten.

Schaubild 6: Einfluß einer einstündigen Erhitzung auf die serologische Aktivität von Rohenterotoxin B gelöst in rekonstituierter Trockenmilch mit einer Endkonzentration von 7,0 mcg/ml.



Bei den Versuchen mit der geringeren Enterotoxinkonzentration (0,7 mcg/ml) fiel der MANCINItest bei der Erhitzung auf 70°C bzw. 80°C negativ ($< 0,15$ mcg/ml) aus. Bei 60°C bzw. 90°C verlief dieser Nachweis dagegen positiv ($> 0,3$ mcg/ml) und fraglich (0,3-0,15 mcg/ml) bei der Siedtemperatur. Hinsichtlich der Reaktivierung (sechsinütiges Kochen) wurden auch hier vergleichbare Ergebnisse wie in der vorhergehenden Versuchsreihe 5 mit der höheren Enterotoxinkonzentration festgestellt.

3.6. Destillation

Enterotoxin B war - unabhängig von der Konzentration im Kulturfiltrat (7,0 bzw. 70,0 mcg/ml) - weder im Destillat noch in der Aufschwemmung des Niederschlags aus dem Destillationskolben mit dem MANCINItest nachweisbar. Gleiches traf für das hundertfach konzentrierte Destillat zu. Durch sechsinütiges Kochen beziehungsweise durch 24 stündiges Stehenlassen bei 25°C war es nicht möglich, das inaktivierte Toxin zu reaktivieren.

Der Genuß von 100 ml Destillat, das wasserklar, geruchs- und geschmacksneutral war, bewirkte im Selbstversuch keine für eine Staphylokokkenintoxikation typischen Symptome.

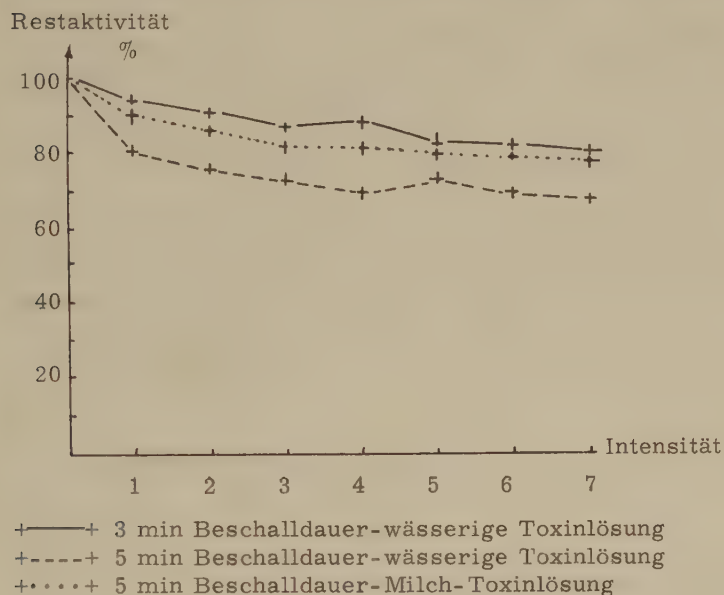
4. Ultraschall

Die Beschallung der Kulturfiltrate erfolgte im Reagenzglas (Mikrospitze), im Becherglas (Arbeitsspitze mit Kegelaufsatz) bzw. im Durchfluß unter Verwendung des Durchflußresonators. Aus Schaubild 9 geht hervor, daß die Restaktivität des enterotoxinhaltigen Kulturfiltrates (7,0 mcg/ml) nach fünfminütiger Beschallung im Reagenzglas geringer war als nach dreiminütiger Beschallung. Die Intensität der Beschallung (Positionen 1 - 7) war von untergeordneter Bedeutung. Innerhalb dieser Versuchsreihe 1 wurden jedoch selbst bei fünfminütiger Beschallung nie mehr als 30 % des Enterotoxins inaktiviert; bei in Milch verdünntem Enterotoxin (Reihe 5) war die Detoxifizierungsrate bei gleicher Einwirkungszeit von fünf Minuten mit weniger als 20 % noch geringer (Schaubild 7). Höhere Inaktivierungsraten waren erst nach längeren Beschallungszeiten - wie sie in den Reihen 2 und 6 gewählt wurden - zu beobachten (Schaubild 10). Die über 15 Minuten hinausgehende Beschallung erbrachte allerdings keine nennenswerten zusätzlichen Effekte mehr. Auch hier war die Inaktivierung bei dem mit Wasser verdünnten Kulturfiltrat deutlich stärker als bei dem mit Milch verdünnten, obwohl bei letzterem mit höherer Intensität (Position 7) beschallt wurde als bei ersterem (Position 6).

Bei der zehnminütigen Beschallung des in Mengen zu 100 ml in Bechergläsern (Reihe 3) abgefüllten Kulturfiltrates (7,0 mcg Enterotoxin/ml) wurde ebenfalls nur eine teilweise Inaktivierung des Rohenterotoxins festgestellt. Die serologische Aktivität nahm dabei mit zunehmender Beschallungsintensität deutlich ab:

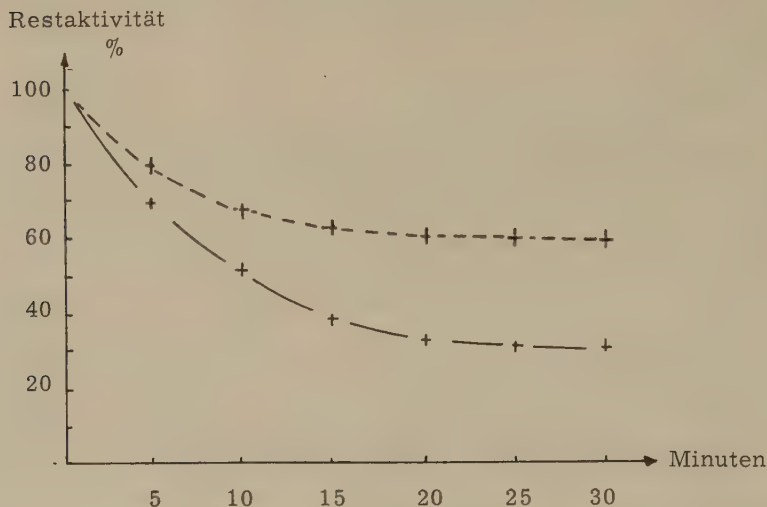
Bei Position 8 betrug sie 90 %, bei Position 9 noch 81 % und bei Position 10 schließlich noch 64 %.

Schaubild 7: Einfluß einer kurzzeitigen Beschallung auf Rohenterotoxin E
(Kulturfiltrat mit 7,0 mcg/ml) im Reagenzglas.



Der serologisch bestimmte Aktivitätsverlust bei dem im Durchflußverfahren (Position 9) beschallten Kulturfiltrat mit 52 mcg Enterotoxin/ml (Reihe 4) belief sich auf 44 %. Die Beschallung im Durchflußverfahren war damit am effektivsten.

Schaubild 8: Einfluß der Beschallungszeit auf Rohenterotoxin B (Kulturfiltrat mit 7,0 mcg/ml) im Reagenzglas.



+——+ Position 6-wässrige Toxinlösung

+-----+ Position 7-Milch-Toxinlösung

5. Adsorption an Aktivkohle

Die Adsorption des Enterotoxins von 1000 ml Kulturfiltrat mit einer Aktivität von 7,0 mcg/ml an 42 g Aktivkohlestaub im Papierfaltensfilter war so weitgehend, daß der serologische Nachweis negativ verlief (Reihe 1). Entsprechendes galt auch für Kulturfiltrat mit 0,7 mcg Enterotoxin/ml, selbst wenn das Filtrat vor der Untersuchung im MANCINItest 100:1 mittels Ultrafiltration konzentriert wurde (Reihe 2). Der biologische Nachweis (Selbstversuch) mit 500 ml des Filtrates war ebenfalls negativ.

Wenn die Aktivkohle (42 g) dem Kulturfiltrat (7,0 mcg Enterotoxin/ml) zugesetzt, gut vermischt und 15 Minuten gerührt wurde, war das Filtrat ebenfalls frei von im MANCINItest nachweisbaren Mengen an Enterotoxin B (Reihe 3).

Bei den in Anlehnung an die Versuchsreihen 1 bzw. 2 durchgeführten Versuchen zur Ermittlung der Adsorptionskapazität der Aktivkohle (Reihe 4) - allerdings mit 5000 ml statt mit 1000 ml Kulturfiltrat (7,0 mcg Enterotoxin/ml) - zeigte sich, daß nach Durchfluß durch das "Aktivkohlefilter" die ersten 15 Proben à 100 ml frei von Enterotoxin in nachweisbaren Mengen waren. In den folgenden Proben wurde Enterotoxin in stetig zunehmenden Mengen gefunden. So betrug der En-

terotoxingehalt z.B. in der 30. Probe 0,7 mcg/ml (10 % der Ausgangsaktivität), in der 40. Probe etwa 12,5 % und in der letzten der 49 Proben noch 15,5 %.

Bei der sich anschließenden Poolung der Proben 1-10 (erster Liter), 11-20 (zweiter Liter), 21-30 (dritter Liter), 31-40 (vierter Liter) und 41-49 (Rest) wurden folgende Enterotoxinkonzentrationen registriert: 0 (erster Liter), 0,35 mcg/ml (zweiter Liter) 0,49 mcg/ml (dritter Liter), 0,7 mcg/ml (vierter Liter) bzw. 0,9 mcg/ml (Rest); die entsprechenden Restaktivitäten beliefen sich damit auf 0 %, 5 %, 7 %, 10 % bzw. 13 %.

In dem Gesamtfiltrat aus den fünf gepoolten Filtraten wurden 0,5 mcg Enterotoxin/ml (7,5 % der Anfangsaktivität) nachgewiesen; nach einem weiteren Durchlauf über dasselbe "Aktivkohlefilter" sank die Restaktivität des Gesamtfiltrates weiter auf etwa 6 %.

D. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

Einer Aufstellung des Center for Disease Control (1976) ist zu entnehmen, daß *Staphylococcus aureus* 1975 in den USA wieder am häufigsten bei bakteriell bedingten Lebensmittelvergiftungen isoliert werden konnte. Die Zahl der Personen, bei denen die Diagnose "Staphylokokkenintoxikation" abgesichert werden konnte, betrug 1973 nur 1272, stieg aber über 1565 (1974) auf 4067 Personen (1975). Salmonellenbedingte Lebensmittelvergiftungen wurden demgegenüber 1975 in den USA nur bei 1573 Personen registriert. Auch wenn vergleichbare Angaben für die BRD nicht vorliegen, so geht allein schon aus den erwähnten Daten die Bedeutung der Staphylokokkenintoxikationen hervor. Da bei den konventionellen Nachweisverfahren (SOMMERFELD und TERPLAN, 1975) langwierige und aufwendige Extraktionsverfahren vorausgehen müssen, ist eine Verbesserung der Methodik zum Enterotoxinnachweis wünschenswert. Eine Voraussetzung für derartige experimentelle Arbeiten ist die Produktion von Enterotoxin und dessen Reinigung. Dabei kann die Umgebung des Menschen kontaminiert werden, so daß eine Gefährdung der menschlichen Gesundheit nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden kann. Um derartige Laborzwischenfälle vermeiden zu können, ist eine Inaktivierung der Enterotoxinrückstände, z. B. an Gefäßen und Geräten, unbedingt erforderlich. Andererseits muß gewährleistet sein, daß das für die experimentellen Versuche verwendete Enterotoxin nicht durch natürliche Umwelteinflüsse (z. B. Sonnenlicht) oder physikalische Faktoren (z. B. Temperatur) in seiner serologischen Aktivität beeinflusst wird. Bei in Lebensmitteln gebildeten Enterotoxinen wäre es wiederum von Vorteil, wenn sie durch derartige Faktoren inaktiviert werden könnten, ohne daß es dabei zu substantiellen Veränderungen des Lebensmittels selbst kommt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte daher geprüft werden, ob und inwieweit Enterotoxin durch natürliche bzw. simulierte Umwelteinflüsse sowie durch physikalische Verfahren inaktiviert werden kann. Die experimentellen Versuche wurden mit Enterotoxin B durchgeführt, da dieser Typ in erheblich größeren Mengen pro ml Medium von *Staphylococcus aureus* synthetisiert wird als die anderen bekannten Enterotoxintypen (BERGDOLL, 1972; RICHTER, 1974). Dabei wurde nicht hochgereinigtes Enterotoxin, sondern durch Filtration aus dem 48 Stunden inkubierten Kulturmedium gewonnenes Rohtoxin verwendet, das zumindest Erhitzungseinflüssen gegenüber stabiler ist als hochgereinigtes Enterotoxin (READ und BRADSHAW, 1966a; SATTERLEE und KRAFT, 1969; TATINI, 1976). Die Bestimmung der Aktivität vor und nach Einwirkung der zu prüfenden Faktoren erfolgte mittels immunologischer Verfahren, und zwar qualitativ mit dem OUCHTERLONY-test (SOMMERFELD und TERPLAN, 1975) und quantitativ mit dem MANCINItest (MANCINI, CARBONARA und HEREMANS, 1965). Auch wenn die Proben im MANCINItest mindestens zweifach angesetzt

wurden und bei jeder Platte stets interne Standards (1 mcg/ml) mitliefen, ist bei der Beurteilung der erzielten Ergebnisse zu berücksichtigen, daß die einfache radiale Immunodiffusion mit einigen Fehlerquellen behaftet ist. Von diesen können neben Pipettier- und Ablesfehlern insbesondere die inhomogene Verteilung des Antiserums im Gel (die durch Kühltankschranklagerung der Platten weitestgehend aufgehoben werden konnte) wie auch der Aktivitätsverlust des als interner Standard mitlaufenden Referenzerotoxins eine Rolle spielen. Um durch diesen Test bedingte größere Fehler weitestgehend ausschalten zu können, wurde der Versuch wiederholt, sofern die Ergebnisse bei Parallelbestimmungen um mehr als 5 % differierten. Auf die Bestimmung der biologischen Aktivität (= Toxizität) wurde mit zwei Ausnahmen verzichtet, da Freiwillige bzw. Affen und Katzen nicht zur Verfügung standen und andere biologische Tests offenbar nicht zum Enterotoxin-nachweis geeignet sind (GANTZE, 1976). Im übrigen scheinen zwischen biologischer und serologischer Aktivität von Enterotoxin B keine erheblichen Unterschiede zu bestehen (SCHANTZ u. a., 1965; READ und BRADSHAW, 1966a; JAMLANG u. a., 1971).

Aus den Modellversuchen ging hervor, daß das Sonnenlicht nur dann innerhalb von 72 Stunden eine erhebliche Inaktivierung (85 - 90 %) des im Kulturfiltrat enthaltenen Rohenterotoxins (7 mcg/ml) bedingte, wenn der Verdunstung z. B. durch Verschluss der Bechergläser mit Cellophan Einhalt geboten wurde oder der Flüssigkeitsverlust dreimal täglich ergänzt wurde. Wenn keine Maßnahmen zur Verhinderung der Verdunstung getroffen wurden und das ursprüngliche Kulturfiltrat infolgedessen innerhalb weniger Stunden vollständig eingetrocknet war, betrug der Aktivitätsverlust demgegenüber nur etwa 30 %. Entsprechendes wurde auch beobachtet, wenn die Proben dem Sonnenlicht nur indirekt ausgesetzt waren, um somit weniger den Einfluß des Sonnenlichts selber als jenen der Sonnenwärme zu ermitteln. In sich anschließenden Modellversuchen zur Wirkung simulierter Umwelteinflüsse konnte dann festgestellt werden, daß die Inaktivierung durch Sonnenstrahlen insbesondere von den IR-Strahlen zum geringen Teil auch von den UV-Strahlen, nicht aber von Strahlen aus dem Bereich des sichtbaren Lichtes ausgeht. Unter vergleichbaren Bedingungen war nämlich die Wirkung der IR-Strahlen erheblich stärker ausgeprägt als jene der UV-Strahlen, während die Strahlen aus dem Bereich des sichtbaren Lichtes keine Inaktivierung hervorriefen. Bei den IR-Strahlen wie auch den UV-Strahlen war die inaktivierende Wirkung im übrigen bei hoher relativer Luftfeuchte weitaus größer als bei niedriger relativer Luftfeuchte. Die inaktivierende Wirkung der auch als Wärmestrahlen bezeichneten IR-Strahlen, die insbesondere im Wasser absorbiert werden, läßt sich offensichtlich nur dann gut nutzen, wenn Enterotoxin in Lösung vorliegt und die Austrocknung durch eine hohe relative Luftfeuchte verhindert werden kann. Infolgedessen war das unter den Einwirkungen des Sonnenlichts und der Sonnenwärme eingetrocknete Kulturfiltrat gegen den IR-Bereich wie auch das restliche

Strahlenspektrum weitestgehend resistent. In Modellversuchen zur Austrocknung bei Zimmertemperatur sowie im Brutschrank zeigte sich dann, daß das Enterotoxin unter diesen Voraussetzungen eher stabilisiert als inaktiviert wird. So konnte weder nach einer dreitägigen Lagerung des Enterotoxins in offenen Petrischalen bei Zimmertemperatur noch im Brutschrank bei 30 bzw. 40°C ein Aktivitätsverlust festgestellt werden. Selbst bei 50°C wurde nur eine Abnahme von weniger als 10 % nachgewiesen.

Während in der Literatur keine Angaben über den Einfluß von Sonnenlicht und -Wärme (bzw. UV-, IR-, Licht-Strahlen, Austrocknung) auf die serologische Aktivität von Enterotoxin B zu finden waren, sind Untersuchungen zum Einfluß verschiedener Temperaturen auf die Stabilität von Enterotoxin B des öfteren durchgeführt worden - allerdings im Gegensatz zu den eigenen Versuchen zumeist mit reinem Enterotoxin. Bei Temperaturen unter dem Nullpunkt wie auch bei Kühlschranktemperaturen war die Aktivität des enterotoxinhaltigen Kulturfiltrates nach 7 Monaten noch unverändert. Bei Zimmertemperatur hatte der Enterotoxingehalt zwar innerhalb des gleichen Zeitraumes um etwa die Hälfte abgenommen, doch hatte die langsam zunehmende Inaktivierung erst nach Ablauf eines Monats begonnen. Nach SCHANTZ u. a. (1965) war in 0,05 m Phosphatpuffer gelöstes Enterotoxin B bei 22-25°C im Bereich von pH 4,0 bis pH 7,3 mit einer Woche und einigen Tagen nicht ganz so stabil. Lyophilisiertes und anschließend bei Temperaturen unter dem Nullpunkt gelagertes Kulturfiltrat hatte nach 7 Monaten nichts von seiner serologischen Aktivität eingebüßt. Zu ähnlichen Ergebnissen waren auch SCHANTZ u. a. (1965) gekommen, die beobachteten, daß gefriergetrocknetes und über ein Jahr bei 4°C gelagertes Enterotoxin B nicht an biologischer Aktivität abgenommen hatte, wohl aber bei Zimmertemperatur aufbewahrtes Lyophilisat. Dennoch ist die Gefriertrocknung und anschließende Lagerung bei Kühlschranktemperaturen kein besonders gut geeignetes Verfahren für die Vorratshaltung von enterotoxinhaltigem Kulturfiltrat, da die serologische Aktivität durch das Lyophilisieren des Kulturfiltrats um ca 50 % herabgesetzt wird. NISKANEN und LINDROTH (1976) hatten ähnliche Verluste bei der Gefriertrocknung aus Lebensmitteln extrahierten Enterotoxins (Typ A) registriert, doch liegen bei sehr reinem Enterotoxin B andere Verhältnisse vor.

Bei Erwärmung der enterotoxinhaltigen Kulturfiltrate auf Temperaturen von 60 bis 99°C im Wasserbad wurde in allen Versuchen eine partielle Inaktivierung des Enterotoxins registriert. Die dabei erzielten Ergebnisse decken sich allerdings - wie auch den in der folgenden Übersicht auszugsweise wiedergegebenen Daten entnommen werden kann - nur teilweise mit den Befunden anderer Autoren.

Übersicht 6: Vergleich einiger bei der Hitzeinaktivierung von Rohenterotoxin B erzielter Versuchsergebnisse

Ausgangskonzentration (mcg/ml)	Hitzeinwirkung		Restaktivität (%)	Quelle
	°C	min.		
50	60	204	50	SATTERLEE und KRAFT (1969)
7	60	180	10	eigene Versuche
7	60	240	7	eigene Versuche
100	80	300	5-10	FUNG u. a. (1973)
50	80	14	50	SATTERLEE und KRAFT (1969)
50	80	240	0	SATTERLEE und KRAFT (1969)
7	80	30	23	eigene Versuche
7	80	240	8	eigene Versuche
100	100	180	0	FUNG u. a. (1973)
50	100	37	50	SATTERLEE und KRAFT (1969)
30	99	107	2	READ und BRADSHAW (1966a)
7	99	30	39	eigene Versuche
7	99	120	15	eigene Versuche
7	99	180	12	eigene Versuche

Diese Abweichungen sind darauf zurückzuführen, daß z. T. erhebliche Unterschiede hinsichtlich der Herstellung des Enterotoxins, des Lösungsmediums für das Enterotoxin, der Hitzeinwirkung (Zeit und Temperatur) sowie der Empfindlichkeit des zur Bestimmung der serologischen Aktivität eingesetzten Verfahrens bestanden. Der Literatur kann entnommen werden, daß einige dieser Faktoren (z. B. Enterotoxinkonzentration, Beschaffenheit des Enterotoxins, Art des Lösungsmediums) von entscheidender Bedeutung für die Hitzestabilität von Enterotoxin B sind. Die größere Hitzestabilität von ungereinigtem bzw. in eiweißhaltigen Medien gelöstem Enterotoxin - nach READ und BRADSHAW (1966a und b) war in Veronalpuffer gelöstes 99 % reines Enterotoxin B nach 87,1 min, rohes und ebenfalls in Veronalpuffer gelöstes Enterotoxin B nach 107,3 min. bzw. 99 % reines, in Rohmilch gelöstes Enterotoxin B erst nach 134,2 min bei 99°C nicht mehr nachweisbar - wird darauf zurückgeführt, daß die Enterotoxinmoleküle durch die in unterschiedlicher Menge anwesenden Fremdproteine geschützt werden (SATTERLEE und KRAFT, 1969). Weitergehende, erst kürzlich publizierte Untersuchungen von Lee u. a. ⁺⁾

⁺⁾ Lee, I. C., K. E. STEVENSON und L. G. HARMON (1977): Effect of beef broth protein on the thermal inactivation of staphylococcal enterotoxin B.
Appl. Environm. Microbiol. 33, 341-344.

haben gezeigt, daß auch die Art des Fremdproteins eine Rolle zu spielen scheint, da die Inaktivierung in Fleischbouillon erheblich langsamer eintrat als in Hirn-Herz-Bouillon, obwohl der Eiweißgehalt des letztgenannten Mediums etwas höher war.

Die Inaktivierungsrate war bei den eigenen Versuchen nach 30, 60, 120, 180 bzw. 240 min bei 70 - 85°C stets höher als bei 90 bzw. 99°C. So war z.B. nach einer einstündigen Erhitzung auf 99°C noch ca 1/4 der Ausgangsaktivität nachweisbar, während sich ihr Anteil bei der gleich lang auf 70°C erhitzten Probe auf weniger als 10 % belief. SATTERLEE und KRAFT (1969), JAMLANG u. a. (1971), FUNG u. a. (1973) sowie REICHERT und FUNG (1976) hatten ebenfalls beobachtet, daß auf 80°C bzw. auch auf 70°C (JAMLANG u. a. 1971) erhitztes Enterotoxin B schneller inaktiviert wurde als auf 90, 100 bzw. 110°C erhitztes Enterotoxin. Allerdings war die stärkere Inaktivierung bei 70 bzw. 80°C von diesen Autoren nur zu Beginn der Erhitzung - nach FUNG u. a. (1973) innerhalb der ersten 10 bis 30 min - beobachtet worden, während die Inaktivierungsrate anschließend bei 100°C höher war. Vermutlich sind diese Unterschiede ebenfalls auf differierende Versuchsanordnungen zurückzuführen. Zwar führten SATTERLEE und KRAFT (1969) sowie FUNG u. a. (1973) diese Versuche auch mit Rohenterotoxin B durch, doch bestanden gewisse Unterschiede hinsichtlich der Konzentration bzw. Zusammensetzung der zur Enterotoxinproduktion verwendeten Medien. Auf die Bedeutung dieses Faktors im Hinblick auf die Hitzebeständigkeit von Enterotoxin B haben u. a. JAMLANG u. a. (1971) sowie LEE u. a. (1977) bereits hingewiesen. SATTERLEE und KRAFT (1969) verwendeten darüberhinaus zuvor gefriergetrocknetes Kulturfiltrat, das vor Versuchsbeginn in Puffer rekonstituiert wurde. Außerdem wurden von den beiden genannten Arbeitsgruppen höhere Enterotoxinkonzentrationen - 50 mcg/ml bei SATTERLEE und KRAFT (1969) bzw. 100 mcg/ml, bei FUNG u. a. (1973) - der Erhitzung unterzogen. Bekanntermaßen spielt aber die Enterotoxinkonzentration eine wichtige Rolle im Hinblick auf die Hitzebeständigkeit von Enterotoxin B (JAMLANG u. a., 1971). Inwieweit die erwähnten oder aber auch andere Faktoren für das Zustandekommen der abweichenden Ergebnisse verantwortlich sind, wird noch zu klären sein. Es wird dabei auch zu prüfen sein, worauf das unterschiedliche Verhalten von Enterotoxin B bei 70 bis 85°C einerseits und bei 90, 100 bzw. 110°C andererseits zurückzuführen ist, auf eine Komplexbildung (SATTERLEE und KRAFT, 1969) oder auf eine reversible Aggregation und/oder Strukturveränderung des Enterotoxins bei 70 - 85°C (JAMLANG u. a., 1971; FUNG u. a., 1973; REICHERT und FUNG, 1976).

Die von anderen Autoren beschriebene Reaktivierung von hitzeinaktivierten Enterotoxin B (JAMLANG u. a., 1971; FUNG u. a., 1973; REICHERT und FUNG, 1976) konnte in den eigenen Versuchen bestätigt werden. Bei den auf 99°C erhitzten Kulturfiltraten war allerdings die von FUNG u. a. sowie REICHERT und FUNG beschriebene Reaktivierung nicht zu beobachten, obwohl nach der Erhitzung noch eine

Restaktivität vorhanden war. Dies ist darauf zurückzuführen, daß die Reaktivierung in Anlehnung an die Empfehlung von JAMLANG u. a. (1971) so durchgeführt wurde, daß die Proben 6 min gekocht wurden. Diese Art der Reaktivierung wurde gewählt, da die von FUNG u. a. (1973) empfohlene Methode zur Reaktivierung (Lagerung bei 25°C über 24 Std.) in eigenen Versuchen bei hitzeinaktiviertem Enterotoxin B eine geringere Reaktivierungsrate ergeben hatte. Zwischen der serologischen Restaktivität nach der Reaktivierung und der bei der vorhergehenden Erhitzung einwirkenden Temperatur bestand insofern eine enge Beziehung, als die serologische Restaktivität mit steigenden Erhitzungstemperaturen abnahm. So betrug die Restaktivität bei 99°C nach einer Stunde 25 % bzw. nach zwei Stunden 15 %, bei 70°C mindestens 70 % und bei 90°C noch knapp 50 % der Ausgangskonzentration von 7 mcg Rohenterotoxin B/ml. Auch FUNG u. a. (1973) sowie REICHERT und FUNG (1976) hatten ähnliche Beziehungen beschrieben.

Mit Hilfe der Destillation, die allerdings ein sehr aufwendiges Verfahren darstellt, konnte eine vollständige Inaktivierung von Enterotoxin B erreicht werden. Selbst mit einer durch Einengung gesteigerten Nachweisempfindlichkeit von etwa 3 ng Enterotoxin B/ml blieb der Nachweis negativ. Als Indiz für die vollständige Inaktivierung ist in Anlehnung an FUNG u. a. (1973) auch zu werten, daß eine Reaktivierung weder bei der von FUNG u. a. empfohlenen Methode noch mit der von JAMLANG u. a. (1971) beschriebenen Technik zu registrieren war. Die Destillationsanlage war so konstruiert, daß die Hitzeeinwirkung auf das Kulturfiltrat nur relativ kurz war. Die negativen serologischen Befunde in den Destillaten waren somit nicht durch stundenlanges Kochen bedingt. Da auch der Destillationsrückstand, die feste Phase, serologisch inaktiv war, handelt es sich bei der Destillation um einen echten Inaktivierungsprozeß.

Bei der Ultraschallbehandlung war der inaktivierende Effekt nicht sehr ausgeprägt. Die besondere Schwierigkeit der Beschallung im Reagenzglas lag darin, daß die Proben häufig aufschäumten und dann offensichtlich keine weitere Inaktivierung erfolgte. Bei Beschallung im Becherglas kam es zwar nur selten zu störendem Aufschäumen, doch betrug die Inaktivierungsrate bei der größten Beschallungsintensität auch noch weniger als 40 % (innerhalb von 10 Minuten). Die Beschallung im Durchflußverfahren war etwas wirkungsvoller und ist auch für größere Flüssigkeitsmengen geeignet. Eine vollständige Inaktivierung von Enterotoxin B wurde jedoch in keinem Falle bei der Ultraschallbehandlung beobachtet.

Obwohl die Aktivkohleadsorption kein rein physikalischer Vorgang ist, wurde sie im Rahmen dieser Arbeit auch auf ihre Effektivität geprüft. Nachdem bei geringen Kulturfiltratmengen die Möglichkeit der Toxinadsorption erwiesen war, sollte die Adsorptionskapazität von Aktivkohlenpulver bestimmt werden. Sie betrug 20 mcg Rohenterotoxin B/g Aktivkohle bei Durchfluß eines Kulturfiltrats mit 7 mcg/ml. Danach

war die Adsorptionskapazität zwar noch nicht erschöpft, doch wurde weiteres Enterotoxin nicht mehr vollständig adsorbiert. Dabei scheint eine Beziehung zwischen Enterotoxinkonzentration und Adsorptionsvermögen zu bestehen, da bei einer Konzentration von 7 mcg/ml über 80 %, bei einer Konzentration von 1 mcg/ml aber nur etwa 50 % adsorbiert wurden. Die völlige Erschöpfung der Adsorptionskapazität war bei 1 mg Enterotoxin B/g Aktivkohle gegeben. Einerseits dürfte dieser Wert für gereinigtes Enterotoxin erheblich höher liegen, da dann Nährbodenbestandteile und andere Staphylokokkenstoffwechselprodukte kaum mehr vorhanden sind und die Adsorptionskapazität nicht einschränken. Andererseits ist allerdings zu berücksichtigen, daß bei dieser orientierenden Untersuchung so große Aktivkohlemengen verwendet wurden, wie sie z. B. bei der Oberflächenwasseraufbereitung nicht üblich sind. Im übrigen handelt es sich bei der Adsorption von Enterotoxin B an Aktivkohle nicht um einen Inaktivierungsvorgang, da das Toxin nur aus dem flüssigen Medium entfernt wird.

Von den verschiedenen geprüften Möglichkeiten zur Dekontamination von Rohenterotoxin B dürfte demnach höchstens den folgenden zwei Verfahren eine gewisse praktische Bedeutung zukommen:

- 1) IR-Bestrahlung für mindestens 1 Tag, sofern es sich um enterotoxinhaltige Flüssigkeiten (z. B. Trinkwasser) handelt. Der für eine nahezu 100 %ige Inaktivierung bei dünner Schicht erforderliche Zeit- und Energieaufwand dürfte akzeptabel sein.
- 2) Die Adsorption von Enterotoxin an Aktivkohle, die sich ebenfalls nur für Trinkwasser eignet. Geringe Enterotoxinmengen werden von unbelasteter Aktivkohle weitestgehend adsorbiert, bei größeren Mengen ist eine relativ schnelle Erschöpfung der Adsorptionskapazität allerdings nicht auszuschließen.

E. ZUSAMMENFASSUNG

1. Im Hinblick auf die Dekontamination von Laborräumen und Geräten, Abfallbeseitigung und Lebensmittelbehandlung wurde der Einfluß folgender Faktoren auf die serologische Aktivität von Rohenterotoxin B (Kulturfiltrat) geprüft: Sonnenlicht bzw. -wärme, Strahlen (UV-Strahlen, IR-Strahlen, sichtbares Licht), Austrocknung, Temperaturen im Bereich von -12°C bis $+99^{\circ}\text{C}$, Destillation, Ultraschall sowie Adsorption an Aktivkohle. Der Nachweis der serologischen Aktivität erfolgte qualitativ im OUCHTERLONYtest bzw. quantitativ im MANCINItest.
2. Eine erhebliche, durch Einwirkung von Sonnenlicht bedingte Abnahme der serologischen Aktivität (80 - 90 %) war nur gegeben, wenn gleichzeitig eine Verdunstung der Flüssigkeit vermieden wurde.
3. Weiter bewirkten unter den geprüften Versuchsbedingungen nur noch UV- bzw. IR-Strahlen, Temperaturen über etwa 60°C , Destillation sowie Adsorption an Aktivkohle eine über 50 % hinausgehende Inaktivierungsrate. Dabei ergaben sich deutliche Unterschiede hinsichtlich der dafür erforderlichen Einwirkungszeit. Nur im Falle der Destillation wurde das Enterotoxin vollständig inaktiviert. Zwar wurde das Rohenterotoxin bei den auf $70-80^{\circ}\text{C}$ erhitzten Proben stärker inaktiviert als bei höheren Temperaturen, doch war bei den niedrigen Temperaturen auch eine höhere Reaktivierungsrate inaktivierten Enterotoxins zu beobachten. Infolgedessen bestand nach Abschluß der Reaktivierung eine enge Beziehung zwischen dem Prozentsatz des hitzeinaktivierten Enterotoxins und der Erhitzungstemperatur.
4. IR-Strahlen und Adsorption an Aktivkohle sind möglicherweise auch unter praktischen Bedingungen geeignete Verfahren zur Dekontamination von Rohenterotoxin-B-haltigem Wasser. Auch bei Einhaltung definierter Voraussetzungen ist jedoch eine vollständige Inaktivierung nicht zu garantieren.

SUMMARY

1. The ability to affect the serological activity of crude enterotoxin B with respect to decontamination of laboratory and equipment as well as of food and drinking-water was studied with solar light and solar heat, rays (UV-rays, IR-rays, visible light), drying, temperatures between -12°C and $+99^{\circ}\text{C}$, distillation, ultra sonic and adsorption to medicated charcoal. The assay of activity was performed qualitatively by OUCHTERLONY-test and quantitatively by MANCINI-test.
2. Solar light caused a high loss of serological activity (80 - 90 %) of toxin solutions, if evaporation of the liquid was avoided.
3. Among the other factors UV- and IR-rays, temperatures above 60°C , distillation as well as adsorption to medicated charcoal caused inactivation rates of more than 50 %. Obvious differences concerning the required period of treatment were found. Only by distillation enterotoxin was completely eliminated. By heating to $70 - 80^{\circ}\text{C}$ more enterotoxin was inactivated than by heating at higher temperatures, but after treatment at lower temperatures the reactivation-rate of inactivated enterotoxin was higher. Therefore after reactivation a good correlation between the percentage of inactivated enterotoxin and applied temperature was found.
4. IR-rays and adsorption to medicated charcoal could possibly be used under practical conditions to decontaminate enterotoxin B from water. Complete inactivation may not even be guaranteed if defined conditions are observed.

F. LITERATURVERZEICHNIS

ANGELOTTI, R. (1969):

Staphylococcal intoxications.

in: RIEMANN, H.: Food-borne infections and intoxications.

1. Aufl. Academic Press, New York und London, 359-393.

AVENA, R. M. und M. S. BERGDOLL (1967):

Purification and some physicochemical properties of enterotoxin C, *Staphylococcus aureus* strain 361.

Biochemistry 6, 1474-1480.

BAUMGART, J. (1970):

Konservierung von Bakterien durch Trocknen an Porzellanbruchstücken.

Fleischwirtschaft 50, 966.

BENNETT, R. W. (1971):

persönl. Mitteilung

BERGDOLL, M. S. (1967):

The staphylococcal enterotoxins.

in: MATELES, R. I. und G. N. WOGAN: Biochemistry of some microbial toxins.

Massachusetts Institute of Technology Press.

DERSELBE (1969):

Bacterial toxins in food.

Food Technol. 23, 530-533.

DERSELBE (1970):

Enterotoxins.

in: MONTIE, T. C., S. CADIS und S. J. AJL: Microbial toxins, Bd. 3, 266-326.

Academic Press, New York und London

DERSELBE (1972):

The enterotoxins.

in: COHEN, J. O.: The staphylococci, 301-331.

Wiley-Insience, New York, London, Sidney, Toronto.

BERGDOLL, M. S., M. J. SURGALLA und G. M. DACK (1959):

Staphylococcal enterotoxin: Identification of a specific precipitating antibody with enterotoxin-neutralizing property.

J. Immunol. 83, 334-338.

BERGDOLL, M. S., C. R. BORJA und R. M. AVENA (1965):

Identification of a new enterotoxin as enterotoxin C.

J. Bact. 90, 1481:1485.

- BERGDOLL, M.S., C.R. BORJA, R.N. ROBBINS und K.F. WEISS (1971): Identification of enterotoxin E.
Infect. Immun. 4, 593-595.
- BERGDOLL, M.S., R.N. ROBBINS, K. WEISS, C.R. BORJA, I.Y. HUANG und F.S. CHU (1973):
The staphylococcal enterotoxin: similarities.
Contributions to Microbiology and Immunology 1, 390-396.
- BORJA, C.R. und M.S. BERGDOLL (1967):
Purification and partial characterization of enterotoxin C produced by *Staphylococcus aureus* strain 137.
Biochemistry 6, 1467-1473.
- BORJA, C.R., E. FANNING, I.Y. HUANG und M.S. BERGDOLL (1972):
Purification and some physicochemical properties of staphylococcal enterotoxin E.
J. Biol. Chem. 247, 2456-2463.
- CASMAN, E.P. (1960):
Further serological studies on staphylococcal enterotoxin.
J. Bact. 79, 849-856.
- DERSELBE (1967):
Staphylococcal food poisoning.
Health Lab. Sci. 4, 199-206.
- CASMAN, E.P., M.S. BERGDOLL und J. ROBINSON (1963):
Designation of staphylococcal enterotoxins.
J. Bact. 85, 715-716.
- CASMAN, E.P., R.W. BENNETT, A.E. DORSEY und J.A. ISSA (1967):
Identification of a fourth staphylococcal enterotoxin, enterotoxin D.
J. Bact. 94, 1875-1882.
- CHU, F.S., K. THADHANI, E.J. SCHANTZ und M.S. BERGDOLL (1966):
Purification and characterization of staphylococcal enterotoxin A.
Biochemistry 5, 3281-3289.
- DANGERFIELD, H.G. (1973):
Effect of enterotoxins after ingestion by humans.
Vortrag, Ann. Meeting Am. Soc. Microbiol.
- DENNY, C.B., P.L. TAN und C.W. BOHRER (1966):
Heat inactivation of staphylococcal enterotoxin A.
J. Food Sci. 31, 762-767.
- DENNY, C.B., J.Y. HUMBER und C.W. BOHRER (1971):
Effect of toxin concentration on the heat inactivation of staphylococcal enterotoxin A in beef bouillon and in phosphate buffer.
Appl. Microbiol. 21, 1064-1066.

- DENNY, C.B. und Mitarbeiter (1973):
ASM-Seminar, Miami Beach.
zit. nach TATINI, S.R. (1976).
- DORN (1966):
in: DORN Physik. Oberstufe Ausgabe A, 10. Auflage, 378.
Hermann Schroedel Verlag KG, Hannover.
- FRIEDMAN, M.E. und J.D. WHITE (1965):
Immunofluorescent demonstration of cell-associated staphylococcal enterotoxin B.
J. Bact. 92, 1383-1387.
- FUNG, D.Y.C., D.H. STEINBERG, R.D. MILLER, M.J. KURANT-NICK und T.F. MURPHY (1973):
Thermal inactivation of staphylococcal enterotoxins B and C.
Appl. Microbiol. 26, 938-942.
- GANTZE, K. (1976):
Zum Nachweis von Staphylokokkenenterotoxin in Lebensmitteln mittels Froschspematest und dem vorgeschalteten Extraktionsverfahren.
Vet. Med. Diss., München.
- HELBER, W.O. (1977):
In Vorbereitung.
Vet. Med. Diss., München.
- HILKER, J.S., W.R. HEILMAN, P.L. TAN, C.B. DENNY UND C.W. BOHRER (1968):
Heat inactivation of enterotoxin A from Staphylococcus aureus in Veronal buffer.
Appl. Microbiol. 16, 308-310.
- JAMLANG, E.M., M.L. BARTLETT und H.E. SNYDER (1971):
Effect of pH, protein concentration, and ionic strength on heat inactivation of staphylococcal enterotoxin B.
Appl. Microbiol. 22, 1034-1040.
- LANDOLO, J. (1976):
persönl. Mitteilung.
- KATO, E., M. KAHN, L. KUJOVICH und M.S. BERGDOLL (1966):
Production of enterotoxin A.
Appl. Microbiol. 14, 966-972.
- KUHNT, J.V. (1974):
Zum Vorkommen von koagulasepositiven Staphylokokken und Enterotoxinen in sauren Milchprodukten.
Vet. Med. Diss. München.
- MANCINI, G., A.O. CARBONARA und J.F. HEREMANS (1965):
Immunochemical quantitations of antigens by single radial immunodiffusion.
Immunochem. 2, 235-254.

- MARKUS, Z. und G. J. SILVERMAN (1970):
Factors affecting the secretion of staphylococcal enterotoxin A.
Appl. Microbiol. 20, 492-496.
- McLEAN, R. A., H. D. LILLY und J. A. ALFORD (1968):
Effect of meat-curing salts and temperature on production of
staphylococcal enterotoxin B.
J. Bact. 95, 1207-1211.
- NISKANEN, A. und S. LINDROTH (1976):
Comparison of different purification procedures for extraction of
staphylococcal enterotoxin A from foods.
Appl. Environ. Microbiol. 32, 455-464.
- READ, R. B., jr., und J. G. BRADSHAW (1966a):
Thermal inactivation of staphylococcal enterotoxin B in Veronal buffer.
Appl. Microbiol. 14, 130-134.
- DIESELBEN (1966b):
Staphylococcal enterotoxin B thermal inactivation in milk.
J. Dairy Sci. 49, 202-203.
- DIESELBEN (1967):
Gamma-irradiation of staphylococcal enterotoxin B.
Appl. Microbiol. 15, 603-605.
- REICHERT, C. A. und D. Y. C. FUNG (1976):
Thermal inactivation and subsequent reactivation of staphylococcal
enterotoxin B in selected liquid foods.
J. Milk Food Technol. 39, 516-520.
- RICHTER, B. (1974):
Zur Produktion von Staphylokokkenenterotoxin B in verschiedenen
Nährmedien.
Vet. Med. Diss., München.
- SATTERLEE, L. D. und A. A. KRAFT (1969):
Effect of meat and isolated meat proteins on the thermal inactivation
of staphylococcal enterotoxin B.
Appl. Microbiol. 17, 906-909.
- SCHANTZ, E. J., W. G. ROESSLER, J. WAGMAN, L. SPERO,
D. A. DUNNERY und M. S. BERGDOLL (1965):
Purification of staphylococcal enterotoxin B.
Biochemistry 4, 1011-1016.
- SCHANTZ, E. J., W. G. ROESSLER, M. J. WOODBURN, J. M. LYNCH,
H. M. J. JACOBY, S. J. SILVERMAN, J. C. GORMAN und L. SPERO
(1972):
Purification and some chemical and physical properties of staphylococ-
cal enterotoxin A.
Biochemistry 11, 360-366.

SIMON, E. (1976):
persönl. Mitteilung.

SOMMERFELD, P. und G. TERPLAN (1975):
Methoden zum Nachweis von Staphylokokkenenterotoxinen.
Arch. Lebensmittelhyg. 26, 128-137.

SOO, H. M., S. R. TATINI und R. W. BENNETT (1973a):
Thermal inactivation of staphylococcal enterotoxins A and D in
certain foods.
Abstr. Ann. Meeting Am. Soc. Microbiol., p. 14. Zit. nach
TATINI, S. R. (1976).

DIESELBEN (1973b):
Thermal inactivation of staphylococcal enterotoxins A and D.
Abstr. Ann. Meeting Am. Soc. Microbiol., p. 1. Zit. nach
TATINI, S. R. (1976).

STINSON, J. V. und J. A. TROLLER (1974):
Characterization of the thermal destruction of enterotoxin B at frying
temperatures.
Work documents, topic 4 C: Human infections and intoxications due to
microbes associated with foods.
IV International Congress of Food Science and Technol., Madrid, 1974.
Zit. nach TATINI, S. R. (1976).

TATINI, S. R. (1976):
Thermal stability of enterotoxins in food.
J. Milk Food Technol. 39, 432-438.

WHO (1976):
Microbial aspects of food Hygiene.
Technical Report Series No 598.

Abschließend möchte ich Herrn Professor Terplan für die Überlassung des Themas und Herrn Dr. Zaadhof für seine Betreuung danken.

Die freundliche Unterstützung von Herrn Professor Müller, Lehrstuhl Tierhygiene, Universität Stuttgart-Hohenheim ersparte mir eine Serie von Mißerfolgen.

Mein besonderer Dank gilt Elisabeth Simon, die mir mit ihrem fundierten theoretischen Wissen nicht selten weiterhalf, und Herrn Aschenbrenner, der bei technischen Fragen nicht nur ein offenes Ohr hatte, sondern zumeist auch eine brauchbare Lösung fand.

Schließlich ermöglichte erst ein Tip von Wolfram Helber das Zustandekommen dieser Arbeit.

Lebenslauf

Ich wurde am 6. Dezember 1949 als zweites Kind der Eheleute Elfriede und Rudolf Locher in Owen/Teck geboren. Von 1957 bis 1961 besuchte ich die Grundschule Owen, anschließend das Gymnasium in Kirchheim/Teck und wurde 1969 nach bestandenen Abitur entlassen. Im Sommersemester 1970 war ich an der Universität Stuttgart-Hohenheim eingeschrieben. Ab dem Wintersemester 1970/71 studierte ich in München Tiermedizin. Nach bestandenen Staatsexamen erhielt ich im Dezember 1975 die Bestallung zum Tierarzt vom Bayrischen Ministerium des Innern. Ab Februar 1976 arbeitete ich bei Herrn Professor Terplan, Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, an meiner Dissertation. Seit März 1977 bin ich als praktischer Tierarzt angestellt.

